

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE de LYON

Année 1963 — N° 497

Etude d'une Méthode Turbidimétrique de Détermination de l'Anti-Pneumo-Hyaluronidase Sérique

THESE

DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon, le 21 Mars 1963

PHAN - THAI - AN

Né le 30 Mars 1935 à DONG-THAI RACHGIA (Sud-Vietnam)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON
1963

**Etude d'une Méthode Turbidimétrique
de Détermination
d'Anti-Pneumo-Hyaluronidase Sérique**

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE de LYON

Année 1963 — N° 497

Etude d'une Méthode Turbidimétrique de Détermination d'Anti-Pneumo-Hyaluronidase Sérique

THESE

DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon, le 21 Mars 1963

PHAN - THAI - AN

Né le 30 Mars 1935 à DONG-THAI RACHGIÀ (Sud-Vietnam)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON
1963



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. J. LEPINE	membres de l'Institut
Doyen	M. H. HERMANN,	Correspondant de l'Institut
Assesseur	M. LEVRAT	
Assesseur	L. REVOL	

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

Physiologie	MM. HERMANN
Clinique Urologique	CIBERT
Physique Biologique, (détaché à Beyrouth)	PONTHUS
Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale	DECHAUME
Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire	ROCHET
Chimie organique et Toxicologie	CHAMBON
Clinique Chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique Médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique Médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique Chirurgicale A	MALLET-GUY
Clinique de chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile	GUILLEMINET
Pharmacie galénique et matière médicale	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du Travail	BOURET
Clinique Médicale A	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Clinique stomatologique	DUCLOS
Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge	BERNHEIM
Biologie médicale et pharmacodynamie	JOURDAN
Botanique et Cryptogamie	NETTEN
Clinique Chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et Déontologie	ROCHE
Parasitologie et Pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'Audio-Pho- nologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Aller- gologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSEL Jean
Cancérologie	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARJET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY
Histologie et embryologie	KEHL
Radiologie	PAPILLON
Clinique des Maladies Infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et Pathologie obstétricales	BANSILLON

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	M. BERGER
Technologie pharmaceutique	DORCHE
Physiologie	CIER J.-François
Bactériologie	BERTOYE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	ROMAN
Physiologie	CHATONNET
Pharmacie et Pharmacologie	CIER André
Chimie organique et toxicologie	PERROT Louis

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie pathologique	FEROLDI Jacques
Chimie biologique et médicale	CREYSSEL Roger
Anatomie	DUROUX Emile
Thérapeutique	BRETTE René
Histologie	DUMONT Louis
Hygiène	THIVOLET Jean
Parasitologie	GARIN Jean-Paul
Physique	MORET Robert
Anatomie	BOUCHET Alain
Anatomie pathologique	TOMMASI Michel
Hygiène	RIFFAT Georges
Pathologie expérimentale	JOUVET Michel
Hématologie	FAVRE-GILLY Jean
Botanique et Cryptogamie	ODDOUX Lucien
Chimie analytique	MALLEIN René
Chimie biologique	GRAS Jean
Physique	PEYRIN Jean-Olivier

AGREGES EN EXERCICE

Médecine générale	GUINET Paul
Médecine générale	PONT Maurice
Médecine générale	VIGNON Georges
Médecine générale	REVOL Louis
Médecine générale	PLAUCHU Marcel
Médecine générale	TRAEGER Jules
Chirurgie générale	MARION Pierre
Chirurgie générale	MICHAUD Pierre
Chirurgie générale	JAUBERT
Chirurgie générale	de BEAUJEU
Chirurgie générale	SAUTOT Jean
Chirurgie générale	GUILLEMIN Georges
Obstétrique	BURTHIAULT René
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX Marcel
Pédiatrie, Puériculture	FRANÇOIS René
Stomatologie	FREIDEL Charles
Médecine générale	DEVIC Michel
Médecine générale	DESPIERRES Charles
Chirurgie générale	de MOURGUES Georg.
Chirurgie générale	FRANCILLON Jacques
Chirurgie générale	SAUBIER Eugène
Dermatologie	COLOMB Daniel
Médecine légale	COLIN Marcel
Médecine du Travail	TOLOT François
Neurologie, Psychiatrie	GUYOTAT Jean
Neurologie	SCHOTT Bernard
Obstétrique	DUMONT Martial
Ophthalmologie	BONAMOUR Georges
Urologie	DURAND Louis-Noël
Médecine générale	GARDE Alexandre
Médecine générale	PERRIN André
Médecine générale	LARBRE François
Médecine générale	MORNEX René
Chirurgie générale	NORMAND Jean
Chirurgie générale	MARET Gilbert
Electro-radiologie	DESCOTTES Jacques
Neuro-chirurgie	CHASSARD Jean-L.
Ophthalmologie	ALLEGRE Georges
Orthopédie	HUGONNIER René
Oto-rhino-laryngologie	FAYSSE Robert
Pneumo-phthisiologie	GAILLARD Jean
	KALB Jean-Claude

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur CROIZAT
Monsieur le Professeur A. REVOL
Monsieur le Professeur A. BERTOYE
Monsieur le Professeur DORCHE

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CROIZAT

Professeur de Clinique Médicale

Médecin des Hôpitaux

Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

C'est pour nous un très grand honneur qu'il daigne bien accepter de présider notre jury de thèse. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. REVOL

*Professeur de Pharmacie Galénique et de matière médicale
Pharmacien-Chef de l'Hôpital du Vinatier*

Ce fut pour nous un grand regret d'avoir quitté son laboratoire où, assisté de M. A. Revol, Chef de Travaux, il avait guidé nos premiers pas.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BERTOYE

*Professeur de Bactériologie
Médecin des Hôpitaux
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon*

Il a été un de nos premiers guides en Bactériologie, en nous acceptant dans son laboratoire. Au cours de notre monitorat nous avons pu apprécier ses qualités d'Homme, de Maître et surtout son extrême gentillesse.

Nous le prions de bien vouloir trouver dans ce travail le témoignage de notre attachement et de notre profonde gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DORCHE

*Professeur de Technologie pharmaceutique
Pharmacien-Chef de l'Hôpital de la Croix-Rousse*

Il a bien voulu s'intéresser à notre travail et nous fait honneur aujourd'hui de juger cette thèse. Au cours de nos années d'étude il a été toujours plein de gentillesse, de bienveillance et de compréhension envers nous.

Qu'il veuille bien trouver ici notre meilleur souvenir et le témoignage de nos sentiments respectueux et reconnaissants.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MONNET

*Médecin des Hôpitaux
Professeur de Bactériologie*

Il était un de nos maîtres en Bactériologie. Nous le prions de trouver ici notre attachement et notre respect.

A MONSIEUR M. CARRAZ

*Chef de Travaux Pratiques de Bactériologie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon
Chef du Service d'Immunologie à l'Institut Pasteur de Lyon*

C'était grâce à lui que nous avons pu travailler au laboratoire de Bactériologie. Il nous a toujours accordé sa confiance. Ensuite il a bien voulu nous accepter dans son service à l'Institut Pasteur de Lyon où ce travail a été effectué.

Nous le prions de trouver ici toute notre reconnaissance et notre attachement.

A MONSIEUR LE DOCTEUR J. VIAL

Chef de Service à l'Institut Pasteur de Lyon

Il a bien voulu nous confier ce travail qui fait partie de son programme de recherche. Nous lui sommes infiniment reconnaissants. Si ce travail a pu être mené à bien et terminé, c'est grâce à ses directives, à ses conseils.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre gratitude.

A MADAME LE DOCTEUR VIAL

Pharmacien

Cette thèse est pour nous une heureuse occasion de lui exprimer tous nos sentiments les meilleurs. Elle fut toujours pour nous d'une bonté et d'une gentillesse exceptionnelles. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre affection et de notre reconnaissance.

A MONSIEUR VEYSSERE

A MADAME VEYSSERE

Pharmacien
Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Lyon

La plus grande partie de ce travail a été effectuée grâce à ses soins et à son aide.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre éternelle reconnaissance et de notre profond attachement.

A MADAME ET MONSIEUR SAINT-PIERRE

A MADEMOISELLE LARTIGUE

A MADEMOISELLE GENEVEY

A MADAME NAZ

A MADEMOISELLE BREDY

A TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE D'IMMUNOLOGIE
DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON ET DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Parmi les différents anticorps sériques correspondant aux enzymes d'origine bactérienne que l'on sait doser actuellement, les antienzymes streptococciques occupent de loin le premier rang. Cependant des hyaluronidases, des lysines sont sécrétées non seulement par le streptocoque, mais aussi par le pneumocoque et le staphylocoque ; ce dernier, en outre, est susceptible de sécréter des kinases (comme le streptocoque) et des coagulases. Les dosages d'antistaphylolysines firent l'objet d'assez nombreuses études, il y a une trentaine d'années, puis tombèrent dans l'oubli ; il semble qu'actuellement ils provoquent un certain intérêt. Par contre, les déterminations d'antienzymes pneumococciques n'ont été l'objet que d'un très petit nombre de travaux, notamment ceux de Thompson et ses collaborateurs (18, 19, 20, 21, 22), de Kulonen (12), de Tunevall G. (24).

Il est cependant possible que l'étude des antienzymes staphylococciques et pneumococciques ne soit pas dépourvue d'intérêt clinique ; il est certain que, comparativement à l'étude des antienzymes streptococciques, elle est d'un intérêt capital pour aider à résoudre les problèmes, posés ces dernières années, au sujet de la spécificité des antienzymes streptococciques.

Depuis quelques temps une étude générale de ces antienzymes fut entreprise dans le laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon. Le premier stade devait comporter évidemment l'étude des techniques de détermination de ces anticorps. Celles-là sont assez diverses. Il était donc intéressant, pour un laboratoire qui s'intéresse à l'étude d'un grand nombre d'antienzymes, d'origine voisine, de s'efforcer d'unifier les techniques de dosage. C'est dans ce but que nous avons entrepris notre travail : prenant pour sujet le dosage de l'anti-hyaluronidase d'origine pneumococcique (dosage rarement étudié pour

lui-même jusqu'à ce jour et pratiqué par simple transposition du dosage des antistreptohyaluronidases), nous nous sommes efforcés de mener cette étude de façon à pouvoir en étendre les conclusions aux dosages d'antienzymes voisines.

En outre nous avons conduit notre travail dans un but essentiellement pratique, consistant en la description d'une méthode de dosage la plus simple possible, réalisable en assez grande série, n'exigeant pas des manipulateurs très spécialisés, et éliminant autant que possible les causes d'erreur dues aux variations accidentelles de tous les facteurs (température, molarité et pH des tampons, etc...) qui rendent si délicates les déterminations enzymatiques.

La hyaluronidase est une enzyme qui dépolymérise l'acide hyaluronique. Les principes de dosage consistent donc à mesurer le temps nécessaire pour dégrader une certaine quantité d'acide hyaluronique, en partant d'une solution donnée d'enzyme, ou à diluer plus ou moins cette solution de façon à obtenir en un temps donné, la dépolymérisation d'une quantité définie d'acide hyaluronique.

L'essentiel est de pouvoir différencier l'acide polymérisé de l'acide dépolymérisé. On peut pour cela utiliser des procédés viscosimétriques : l'acide polymérisé est très visqueux, l'acide dépolymérisé l'est beaucoup moins. On peut donc mesurer la viscosité de l'acide hyaluronique avant et après l'action de l'enzyme, la différence obtenue permettant de mesurer l'activité enzymatique.

On peut également utiliser les propriétés des mucoprotéines en général (et de l'acide hyaluronique en particulier) de donner un précipité ou un coagulum avec des protéines plus ou moins dénaturées en milieu acide. Dans le « MCP » Test de Mc Clean (14), on met en présence l'acide hyaluronique et la protéine, puis on ajoute de l'acide : il se forme un coagulum, un « Mucin Clot ». Si l'acide hyaluronique a été préalablement dépolymérisé par la hyaluronidase, aucun coagulum ne se produit : il y a eu obstacle à la formation de ce coagulum, d'où le nom de « Mucin Clot Prevention » Test.

Les procédés turbidimétriques sont pour la plupart dérivés de la réaction de Seastone, qui utilise un mode opératoire légèrement différent : l'acide hyaluronique est additionné d'un réactif constitué de protéines (comme celles du sérum de cheval ou de lapin) dénaturées et mises en solution dans un milieu de pH très acide (voisin de 3 à 4). Si l'acide hyaluronique est polymérisé, il survient un trouble qui, dans

certaines limites, est proportionnel à la quantité d'acide hyaluronique polymérisé.

Cette dernière réaction est la base de presque toutes les techniques proposées pour doser les hyaluronidases et antihyaluronidases streptococciques en biologie clinique ; elle présente l'inconvénient d'utiliser un réactif non constant, de préparation plus ou moins empirique : cette protéine dénaturée. Aussi certains auteurs ont proposé d'utiliser une réaction turbidimétrique analogue employant non plus ce réactif sérique, mais des sels d'ammonium quaternaire. Ces derniers, dans des conditions bien précises et variant selon leur nature, peuvent donner une turbidité proportionnelle à la quantité de mucoprotéine présente dans le milieu. Encore faut-il bien choisir le sel d'ammonium, car certains d'entre eux donnent des précipités non seulement avec l'acide hyaluronique lui-même, mais avec les produits de sa dépolymérisation.

Nous n'avons pas adopté ce groupe de réactifs dans nos expériences, pour la raison suivante : le trouble obtenu, contrairement à celui résultant de l'action des protéines dénaturées, est toujours plus ou moins labile : ce qui nécessite une lecture à temps très précis après l'addition du réactif ; cette nécessité est souvent peu conciliable avec l'examen d'un grand nombre de tubes, comme cela se produit dans les dosages cliniques en série que nous avons eu l'occasion de pratiquer.

★ ★

Quel que soit le révélateur de l'acide hyaluronique utilisé, l'ensemble de nos réactions affecte le schéma suivant :

ANTICORPS — ENZYME — SUBSTRAT

c'est-à-dire : ANTIPNEUMOHYALURONIDASE — PNEUMOHYALURONIDASE — ACIDE HYALURONIQUE. Pour une étude quantitative de l'un ou de l'autre des maillons de cette chaîne de réactions il faut un élément de référence.

On peut utiliser le SUBSTRAT : l'acide hyaluronique, obtenu à un degré de pureté convenable, est un réactif très stable, d'excellente conservation, qui se présente comme un bien meilleur élément de référence que ne peuvent être ni les hématies de lapin (substrat pour le dosage des lysines bactériennes), ni le caillot de plasma (substrat pour le dosage des kinases bactériennes). Mais cet acide est difficile

à définir, et selon les procédés de fabrication, les acides hyaluroniques utilisés dans tel ou tel laboratoire peuvent être assez différents. Il est légitime pour un laboratoire utilisant un acide hyaluronique d'un même lot de fabrication (et contrôlé par rapport au lot antérieur) d'utiliser ce substrat comme élément de référence : les résultats qu'il obtiendra seront parfaitement comparables entre eux, mais il est présomptueux de comparer, en valeur absolue, les résultats obtenus dans des laboratoires différents ; et l'unité d'antihyaluronidase (que nous définirons plus loin dans notre exposé) peut être fort différente de l'unité d'un autre laboratoire utilisant une technique identique, mais un acide hyaluronique différent.

On peut utiliser l'ENZYME : mais il conviendrait d'avoir une enzyme internationale, servant d'étalon aux laboratoires qui peuvent étalonner sur elle les enzymes de leur propre production. Par ailleurs, l'inconvénient d'un tel procédé est la conservation relativement moins bonne de l'enzyme que celle de l'anticorps correspondant.

On peut utiliser l'ANTICORPS : l'anticorps est considéré comme référence dans les systèmes possédant un étalonnage international :

antilyisine - lysine streptococcique

antilyisine - lysine staphylococcique

Encore faut-il que cet anticorps possède une spécificité convenable pour être d'un intérêt pratique. Soit un anticorps étalon préparé avec, par exemple, une lysine d'une souche de streptocoque donnée : cet anticorps est bien opposé à l'enzyme qui lui a donné naissance, mais si l'on veut qu'il soit utilisable, encore faut-il qu'il ait le même pouvoir inhibiteur vis-à-vis des autres lysines préparées à partir de streptocoques de souches différentes. Autrement dit il faut que les enzymes des souches différentes de streptocoques susceptibles d'infecter l'espèce humaine soient douées de propriété antigénique identique. C'est ce qui se produit dans le cas des lysines d'origine streptococcique où l'on admet, dans l'état actuel de nos connaissances, que les streptocoques des groupes A, C, G, c'est-à-dire les streptocoques en général pathogènes pour l'homme, ont des propriétés antigéniques identiques.

Dans le cas des pneumocoques qui nous intéressent ici, aucun travail ne permet de tirer des conclusions analogues. Cependant certains essais faits ces dernières années dans le laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon nous permettent de supposer que la plupart des pneumocoques présentent une même spécificité enzy-

matique et, sous réserve de vérification ultérieure, nous pouvons envisager une méthode utilisant comme référence un sérum étalon anticorps.

Actuellement, certes, il n'y a pas de sérum étalon anticorps défini international, mais ce qui intéresse le clinicien, ce n'est pas la valeur absolue de la quantité d'anticorps contenu dans un sérum de malade, mais cette quantité par rapport à celle existant chez le sujet avant la maladie, ou chez les sujets apparemment sains.

On peut très bien prendre comme sérum de référence un sérum moyen récolté chez un grand nombre de sujets normaux et exprimer les résultats des mesures par rapport au taux de ce sérum moyen considéré comme normal. Ce système de référence, utilisé notamment dans les déterminations de prothrombine, ou des taux d'antistreptokinase dans la technique de A. Bertoye, M. Carraz, Detolle, donne en pratique d'excellents résultats cliniques.

★ ★

La chaîne de réactions indiquées ci-dessus donnera des résultats différents si l'on modifie les modalités de l'expérience : temps d'action des différents stades (soit antigène-anticorps ; soit enzyme-substrat), température de la réaction, pH ou molarité du milieu, etc... Les facteurs les plus favorables à la réaction antigène-anticorps peuvent ne pas être les mêmes que ceux favorisant la réaction enzyme-substrat. Mais comme les réactions ont lieu successivement dans les mêmes tubes, il est parfois difficile de modifier considérablement certains facteurs (comme la molarité et le pH, ainsi que la quantité des ions) au milieu de la chaîne réactionnelle ; il faut donc adopter les facteurs satisfaisant, en pratique, à la fois à la réaction de neutralisation enzyme-antienzyme, et à la réaction enzyme-substrat.

Réservant pour une étude ultérieure la spécificité, propre à certaine espèce ou commune à tous les pneumocoques, des pneumohyaluronidases, nous nous proposons, comme but de ce travail, l'étude des facteurs les plus favorables à la réalisation des réactions successives antienzyme-enzyme et enzyme-substrat.

En outre, dans l'étude de ces facteurs, nous étudierons les résultats soit en les calculant en unités établies par rapport au substrat, soit en les calculant par rapport à un sérum étalon pris comme référence ; ce sérum étalon a été obtenu par le mélange d'un grand nombre de sérums de sujets considérés comme normaux.

CHAPITRE II

DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

1. — REACTIFS

A. — Acide hyaluronique

Nous avons utilisé l'acide hyaluronique préparé à l'Institut Pasteur de Lyon, selon le procédé général suivant :

L'acide hyaluronique est extrait de l'humeur vitrée de bœuf. Les yeux de bœuf sont ouverts rapidement et l'humeur vitrée aussitôt traitée : elle est d'abord homogénéisée au mixter à grande vitesse, puis précipitée par l'alcool dénaturé à 90°. Le gâteau spongieux obtenu est alors traité 4 fois par une solution de chlorure de calcium à 10 % et à pH 8-9. On obtient, en fin d'extraction, un liquide visqueux et trouble d'où l'on doit éliminer les protéines présentes à côté de l'acide hyaluronique. Pour cela on le traite 4 fois par un mélange de chloroforme et d'alcool butylique et finalement on obtient un liquide limpide quoique parfois jaunâtre.

On précipite alors l'acide hyaluronique par l'alcool à 90°. Le floculat est recueilli avec précaution, séché à l'alcool absolu et à l'acétone à plusieurs reprises et finalement sous vide.

Au cours de nos dosages, cet acide sera utilisé sous forme d'une solution dans un tampon, dit tampon I, contenant 50 mg d'acide hyaluronique pour 100 ml. La dissolution est assez longue et il est préférable de préparer la solution 24 heures avant l'emploi. A la glacière, la conservation est excellente.

B. — Hyaluronidase pneumococcique

Nous préparons notre hyaluronidase pneumococcique selon une méthode inspirée de la préparation de la hyaluronidase streptococcique. Le germe que nous avons utilisé est un germe de la collection de l'Institut Pasteur de Lyon N° 350. Nous ensemençons d'abord

ce germe sur un tube de 10 ml de bouillon de formule suivante, voisine de celle du bouillon de Todd-Hewitt, appelé par nous « bouillon spécial ».

- I. 500 g de cœur de bœuf coupés en petits dés.
Eau distillée : 1.000 ml.
Laisser au réfrigérateur toute la nuit ; le lendemain, chauffer 1 heure à 85° en agitant de temps en temps. Passer le bouillon de viande à travers une gaze fine. Mesurer le bouillon obtenu.
- II. Macération de viande : 1.000 ml.
Peptone pancréatique : 10 g.
Peptone pepsique : 10 g.
Ajuster à pH 7,8.
Ajouter :
Cl Na : 2,5 g.
PO⁴ Na² H : 8,3 g.
PO⁴ H² K : 8,3 g.
Autoclaver 20 minutes à 120°.
Filtrer sur filtre Durieux dur et ajouter :
Glucose : 2 g.
Stériliser à 110° pendant 30 minutes.

Les peptones sont fournies par : Réactifs, 91, avenue Paul-Vaillant-Couturier, Gentilly, Seine (France).

Après 48 heures de pousse environ, plus s'il le faut, on ensemence avec ce tube un flacon de 200 ml du même bouillon, et on laisse incuber 3 jours environ. Après avoir vérifié que la production de hyaluronidase est suffisante par le procédé que nous indiquerons plus loin, nous centrifugeons à basse température, puis nous filtrons ce bouillon. Le filtrat est conservé à —10°/—20°.

Cette hyaluronidase est titrée selon la technique habituelle de titrage de la hyaluronidase streptococcique utilisée dans le laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon. Nous définissons une unité turbidimétrique comme la quantité d'enzyme qui, en 30 minutes à 37°, réduit la turbidité donnée par 0,250 mg d'acide hyaluronique, en présence de réactif sérique dans les conditions d'application de la méthode, à la turbidité donnée par 0,125 mg de cet acide (1). L'acide

(1) Quantités qui, pour le titre de la solution d'acide hyaluronique employé, correspondent à 0,50 et 0,25 ml.

hyaluronique que nous utilisons présentant des caractères pratiquement constants, cette unité peut être considérée comme de valeur constante. Elle n'est cependant pas comparable à celle définie de même manière en utilisant une technique identique, mais avec un acide différent du nôtre.

On procède d'abord à un dosage approximatif d'activité de la façon suivante : on dispose dans un portoir 10 tubes à hémolyse. Dans chacun d'eux on met 0,50 ml de tampon I ; dans le premier tube, 0,50 ml du bouillon clair correspondant à la solution de hyaluronidase. On agite ; on prélève à la pipette automatique 0,50 ml de ce mélange, que l'on porte dans le 2^e tube ; on agite ; on prélève à nouveau 0,50 ml de ce mélange que l'on porte dans le 3^e tube, et ainsi de suite...

On a donc dans le premier tube 1/4 de ml de solution enzymatique, dans le deuxième tube 1/8 de ml, dans le troisième 1/16 de ml. Puis on ajoute 0,50 ml de solution d'acide hyaluronique à 0,5 ‰ et on procède selon la technique générale dont les détails seront précisés dans un prochain paragraphe et dont les opérations successives grossièrement résumées sont les suivantes : on laisse durant 30 minutes au bain-marie à 37°, puis on ajoute le réactif sérique. Dans les tubes où subsiste encore de l'acide hyaluronique non dépolymérisé se développe un trouble. Dans le cas où un tube présente une turbidité mesurée au photomètre égale à la turbidité obtenue avec 0,25 ml de la solution d'acide hyaluronique, il y a une unité turbidimétrique. Si aucun tube ne présente cette turbidité, on procède par interpolation à l'aide des tubes voisins. On procède ensuite à un dosage plus précis en diluant l'enzyme de telle sorte que l'on ait une série de tubes contenant des quantités intermédiaires entre les deux tubes dont les turbidités sont immédiatement inférieures et immédiatement supérieures à la turbidité correspondant à 0,125 mg d'acide hyaluronique (soit 0,25 ml de solution).

Prenons un exemple : le tube n° 3 présente une turbidité inférieure à la 1/2 turbidité de référence, le tube n° 4, une turbidité supérieure. Il résulte de cela qu'une unité enzymatique est contenue entre 1/16 et 1/32 de ml d'enzyme, soit environ 0,06 et 0,03 ml. On procédera au dosage précis en diluant notre bouillon au 1/5, et on établira la série suivante :

Enzyme 1/5	0,30 - 0,25 - 0,20 - 0,15
Tampon I	0,20 - 0,25 - 0,30 - 0,35

On ajoute ultérieurement 0,50 ml de tampon I, qui correspond au volume représenté par les sérums à étudier pour leur teneur en anticorps, puis 0,50 ml de solution d'acide hyaluronique. On porte au bain-marie à 37°, 30 minutes, on ajoute le réactif sérique. Si on a une turbidité correspondant à celle de 0,125 mg d'acide hyaluronique, dans le 3° tube correspondant à 0,20 ml de solution 1/5, on dira que 0,04 ml d'enzyme contient une unité.

L'enzyme ainsi titrée est conservée congelée au réfrigérateur à — 10°/— 20°. Des expériences de conservation de cette enzyme seront présentées dans la suite de ce travail.

C. — Réactif sérique et sérum acidifié

Le réactif que nous utilisons pour produire la turbidité révélatrice de l'acide hyaluronique se prépare à partir d'un sérum normal de cheval soumis à un traitement destiné à dénaturer les facteurs sériques. Le sérum est dilué au 1/10 dans du tampon de pH 4, dit tampon II (dont la formule est indiquée plus loin), puis le pH est ramené à 3,1 par addition d'acide chlorhydrique. Ce « sérum acidifié » est alors réparti dans des flacons de 500 ml au maximum, qui sont placés dans un bain-marie à 100° durant 30 minutes au moins. La conservation à la glacière est excellente.

Le réactif sérique s'obtient en mélangeant du sérum ainsi acidifié avec du tampon II. Les proportions de ce mélange peuvent varier d'une préparation à l'autre : albumines légèrement dissemblables d'un sérum à l'autre, petites différences dans la dénaturation ; généralement on emploie une formule proche de :

Sérum acidifié : 1 partie ;

Tampon II : 2 parties.

L'essentiel est qu'il y ait suffisamment de protéine dénaturée pour précipiter l'acide hyaluronique contenu dans 0,50 ml de la solution d'acide hyaluronique décrite ci-dessus, dans le paragraphe A. On se rend compte de la bonne marche du système en dressant une courbe de turbidité obtenue avec le réactif sérique essayé. Pour cela on fait la galerie suivante :

Acide hyaluronique
en solution à 0,250 mg
pour 0,50 ml dans le

tampon I	0,10	0,15	0,20	0,25	..	0,45	0,50 ml
Tampon I	1,40	1,35	1,30	1,25	..	1,05	1,00 ml
Réactif sérique	2	2	2	2	..	2,00	2,00 ml

La courbe des turbidités, si le réactif sérique n'est pas assez riche en protéine, s'infléchit pour des quantités d'autant plus minimales d'acide hyaluronique que la pauvreté protéique du réactif est plus prononcée.

A vrai dire, on introduit dans les divers tubes 0,250 mg d'acide hyaluronique ; ce qui nous intéresse, c'est de savoir si dans un tube il y a la quantité de hyaluronidase qui détruit la moitié de cet acide. donc qui donne une turbidité correspondant à celle donnée par 0,125 mg d'acide. Si l'on avait toujours un tube qui présente cette 1/2 turbidité, le problème serait simple. En réalité on est souvent obligé d'interpoler à partir des tubes plus ou moins troubles que le tube de référence. On doit donc exiger que les points situés en dessus et en dessous du point correspondant à la turbidité de référence soient sur une portion rectiligne de la courbe. Mais comme il est exceptionnel que l'on choisisse, pour l'interpolation, des turbidités très éloignées de cette turbidité de référence, il n'est pas obligatoire d'utiliser un réactif sérique qui donne avec 0,250 mg d'acide hyaluronique une turbidité double de celle donnée par 0,125 mg.

Dans la figure n° 1 nous dressons trois exemples de courbes obtenues avec des réactifs sériques de qualité différente. La courbe A permet des interpolations très étendues. La courbe B correspond à un réactif sérique qui donne avec 0,250 mg d'acide hyaluronique une turbidité qui ne représente pas le double de celle donnée avec 0,125 mg de cet acide. Toutefois la partie rectiligne de la courbe est suffisamment étendue pour permettre des interpolations suffisantes en pratique.

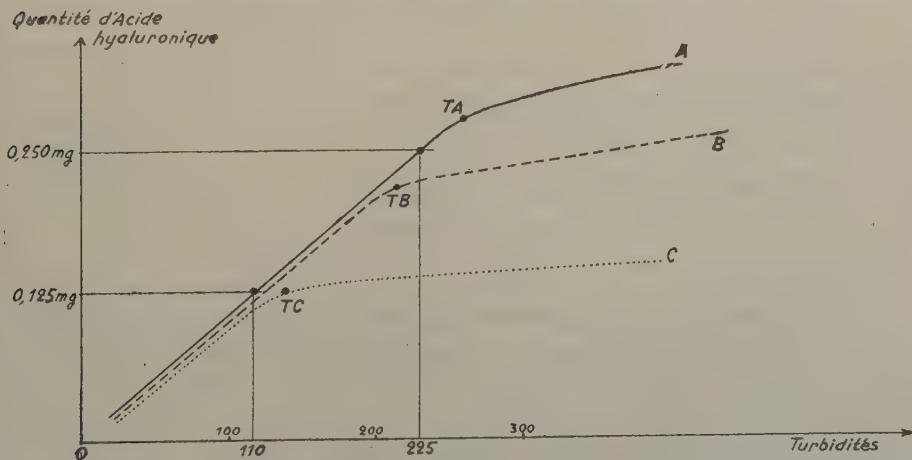


Fig. 1
Les turbidités sont exprimées en D.O. $\times 1.000$

La turbidité maximum utilisable (point TB de la courbe B) représentant une turbidité nettement supérieure à la turbidité de référence. Par contre, le réactif donnant la courbe C n'est pas utilisable : en effet, la turbidité maximum utilisable (point TC de la courbe C) est très proche de la turbidité de référence.

D. — Tampons I et II

Le tampon I est un tampon acéto-acétique de pH 6 et de molarité 0,1 M, on y ajoute du chlorure de sodium à la concentration de 0,15 M.

Le tampon II est un tampon acéto-acétique de pH 4,2 et de molarité 0,5 M.

On prépare l'un et l'autre de ces tampons à partir de solutions stocks d'acide acétique et d'acétate de soude dont les formules sont les suivantes :

Solution stock d'acide acétique 0,5 M :

Acide acétique	142,85 g
Eau distillée q.s.p.	5.000 g

Solution stock d'acétate de soude 0,5 M :

Acétate de sodium	340 g
Eau distillée q.s.p.	5.000 g

On prépare les tampons I et II selon les formules suivantes :

Tampon I :

Solution stock acide acétique 0,5 M	30 g
Solution stock acétate de soude 0,5 M	993 g
Chlorure de sodium	43,8 g
Eau distillée q.s.p.	5.000 g

Tampon II :

Solution stock acide acétique 0,5 M	1.300 ml
Solution stock acétate de soude 0,5 M	3.700 ml

E. — Sérum étalon

Nous avons pris comme sérum étalon un mélange de sérums humains prélevés chez un grand nombre de sujets apparemment normaux.

2. — MATERIEL

Outre le matériel usuel de laboratoire, nous avons utilisé le matériel plus particulier suivant :

— Une pipette automatique (rhéomètre), réglée pour correspondre à une capacité de 0,50 ml.

— Des tubes, type tubes à hémolyse, de 80 mm de hauteur et de 10 mm de diamètre. Ces tubes doivent être constitués de verre de même nature et de même épaisseur. On les essaie en vérifiant le pourcentage de transmission du flux lumineux qu'ils présentent lorsque, remplis d'eau, ils sont placés dans le photomètre « Lumétron ». Ce pourcentage ne doit pas varier entre les différents tubes de plus de 3 à 4 %. Dans ces conditions, les lectures photométriques peuvent se faire directement dans ces tubes sans qu'il soit besoin d'utiliser des cuves spéciales ou des tubes spécialement étalonnés.

— Un bain-marie réglé à 37° et pouvant contenir des portoirs de 100 à 200 tubes précédemment décrits.

— Un photocolorimètre. Nous avons utilisé l'appareil « Lumétron » modèle 401 A qui nous permet de réaliser des dosages en série. Le porte-tube a été légèrement modifié pour recevoir les tubes décrits ci-dessus.

3. — MODE OPERATOIRE

Nos expériences ont été accomplies le plus souvent selon deux techniques que nous décrivons ci-après et dont une partie des opérations est commune.

A. — Technique utilisant comme référence l'acide hyaluronique (Technique A.H.)

C'est la technique dérivant directement de celle utilisée par V. Faber (6, 7, 8) pour le dosage des antistreptohyaluronidases et que nous utilisons légèrement modifiée dans le Laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur (3). Nous avons apporté une modification au mode opératoire de ces techniques : alors que, dans les techniques de V. Faber et de Carraz et Vial, on utilise des quantités fixes d'anticorps et variables d'enzymes, nous utilisons des quantités fixes d'enzymes et variables d'anticorps.

Nous avons vu précédemment comment l'enzyme était titrée par rapport à un acide hyaluronique — cet acide étant bien entendu un mélange homogène de préparations qui nous servira pour toute notre expérimentation. Nous utilisons comme « dose de charge » une quantité d'enzyme comprise entre 2 et 2,5 unités d'enzyme, sous un volume de 0,50 ml.

Des expériences préliminaires nous ont montré que dans les conditions de dilutions que nous décrirons ci-après, il convient de diluer au départ les sérums humains au 1/250.

a) NEUTRALISATION DE L'ENZYME PAR L'ANTICORPS ET MISE EN ROUTE DE LA GALERIE DE VERIFICATION DE LA HYALURONIDASE.

Pour chaque sérum on dispose d'une galerie de 8 tubes. Dans le premier et le deuxième tube, on met à la pipette automatique réglée à 0,50, 0,50 ml de sérum préalablement chauffé à 56° durant 30 minutes, et dilué au 1/250 dans du tampon I. Dans le deuxième tube et les tubes suivants on met 0,50 ml de tampon I, puis on mélange le contenu du deuxième tube et on en prélève 0,50 ml, que l'on porte dans le troisième, on mélange le contenu du troisième tube et on prélève 0,50 ml que l'on porte dans le quatrième, etc... ; après ces opérations, les quantités de sérum 1/250 contenues dans les tubes sont les suivantes :

<i>Tube</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Quantité de sérum 1/250</i>								
<i>en ml</i>	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

A chacun de ces tubes on ajoute alors 0,50 ml de solution d'enzyme correspondant à environ 2 à 2,5 unités. En même temps on prépare une galerie de tubes destinés à déterminer exactement l'activité de la « dose de charge » de hyaluronidase répartie dans les tubes des séries de sérum. Pour cela, on répartit dans les 8 tubes qui constituent cette série, successivement 0,50, 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15 et 0,10 ml d'enzyme. On complète le volume de chacun de ces tubes à 1 ml par du tampon I.

On abandonne alors ces diverses galeries à la température ordinaire durant 24 heures. Durant ce temps se poursuit la neutralisation antigène-anticorps dans les galeries contenant du sérum, alors que

dans la galerie contenant uniquement de la hyaluronidase, celle-là doit subir éventuellement les mêmes altérations que celle contenue dans les galeries de sérum.

b) ACTION ENZYMATIQUE.

Après 24 heures on place toutes ces galeries à 37° au bain-marie et on ajoute 0,50 ml de solution d'acide hyaluronique. On dispose également trois groupes de deux tubes, les tubes du premier groupe contiendront 0,50 ml de la solution d'acide hyaluronique, ceux du deuxième groupe 0,25 ml de la même solution. On dispose 1,50 ml de tampon I dans les tubes du troisième groupe et on complète avec ce même tampon I, au volume de 1,50 ml, les tubes des deux premiers groupes.

A ce stade, tous les tubes au bain-marie doivent contenir 1,50 ml de liquide.

c) MISE EN EVIDENCE DE L'ACIDE HYALURONIQUE NON DEPOLYMERISE.

On laisse ces tubes 30 minutes au bain-marie à 37°, puis on ajoute 2 ml de réactif sérique dans chaque tube. Les tubes sont sortis aussitôt après l'addition de ce réactif. Un trouble se manifeste rapidement dans les tubes contenant de l'acide hyaluronique non dépolymérisé. Si l'on ne dispose que d'une série de sérum et d'une série de calcul d'activité de la hyaluronidase, il suffit de chronométrer exactement le temps de chaque opération pour le 1^{er} tube. Mais si l'on dispose de nombreuses séries de sérum, il faut instituer un système de chronométrage permettant aux différentes opérations de s'effectuer effectivement durant le temps prévu. Par exemple on commencera chaque opération avec un décalage exact de une minute d'une série à l'autre.

La lecture des turbidités développées se fait au photocolorimètre Lumétron, avec un écran jaune. On peut entreprendre cette lecture 20 minutes après l'addition de réactif sérique. Le zéro de l'appareil est fait à l'aide de 2 tubes contenant seulement 1,50 ml de tampon I et 2 ml de réactif sérique. La moyenne des 2 tubes contenant 0,25 ml de réactif sérique préparés au même stade que les précédents, sert à fixer la turbidité de référence correspondant à une unité d'enzyme, et la moyenne des 2 tubes préparés en même temps et contenant 0,50 ml de solution d'acide hyaluronique, sert à vérifier que cette

turbidité est bien le double (1) de la turbidité obtenue avec les tubes contenant 0,25 ml de solution d'acide hyaluronique, et que de ce fait, on est en droit d'utiliser pour interpoler des turbidités comprises entre ces deux valeurs.

d) CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS.

Les calculs et l'expression des résultats se font de la façon suivante : supposons que la turbidité de référence soit intermédiaire entre les turbidités des tubes contenant 0,25 et 0,20 ml d'enzyme. On dira qu'une unité d'enzyme est contenue dans 0,225 ml de la solution d'enzyme, autrement dit que 0,50 ml de cette solution contient $0,50/0,225 = 2,22$ unités de hyaluronidase.

Supposons par ailleurs que pour un sérum donné cette turbidité de référence se retrouve pour le 5^e tube, correspondant à $1/32$ de ml de sérum dilué au $1/250$. Nous dirons donc que le $1/32 \times 1/250$ de ml de sérum a neutralisé une partie de l'enzyme mise en sa présence, de façon à ne laisser subsister qu'une unité (unité qui a détruit la moitié de l'acide hyaluronique sur lequel elle agissait, l'autre moitié ayant entraîné par addition de réactif sérique la formation d'un trouble correspondant à la turbidité de référence). Donc cette quantité de sérum a neutralisé $2,22 - 1 = 1,22$ unité de hyaluronidase. Nous dirons donc qu'un centimètre cube de sérum contient $1,22 \times 32 \times 250 = 9.760$ unités d'anticorps (l'unité d'anticorps étant la quantité d'anticorps qui neutralise une unité d'enzyme).

B. — Technique utilisant comme référence un sérum moyen dit « étalon » (Technique S.E.)

Elle consiste à effectuer parallèlement aux opérations de dosages des sérums à examiner, telles que nous venons de les décrire, une opération analogue avec un sérum considéré comme étalon et constitué de sérums mélangés, provenant de sujets apparemment sains.

La seule différence est que nous constituons notre galerie de sérum étalon avec des dilutions plus proches d'un tube à l'autre, nous procédons ainsi : dans le premier tube nous introduisons 0,50 ml de sérum étalon $1/250$, dans le deuxième tube, 1 ml de cette même dilution. Dans le deuxième tube et dans les tubes suivants, nous

(1) Ou très proche du double.

disposons 0,50 ml de tampon I, nous mélangeons à la pipette automatique le contenu du tube 2, puis nous prélevons 1 ml que nous introduisons dans le 3^e tube. Nous mélangeons le contenu du tube 3, prélevons 1 ml que nous portons dans le tube 4, et ainsi de suite.

Les quantités de sérum étalon de dilutions 1/250 que l'on trouve dans les tubes 1, 2, 3, 4, 5, etc., sont donc 1/2, 1/3, 1/4,5, 1/6,7, 1/10, etc...

La quantité de solution de hyaluronidase ajoutée à chacun de ces tubes (aussi bien pour les séries de sérum sujet que la ou les séries de sérum « étalon ») est la même que celle utilisée dans la technique A.H. : soit celle correspondant à 2 ou 2,5 unités sous le volume de 0,50 ml.

Le déroulement des opérations s'effectue comme dans la technique A.H., cependant il n'est pas nécessaire de faire de galerie destinée à titrer la hyaluronidase.

Nous considérons pour la série étalon le tube réel ou par interpolation le tube virtuel, qui présente la turbidité de référence. Par exemple supposons que cela soit réalisé pour le 4^e tube correspondant à 1/6,7 de ml de sérum étalon au 1/250.

Si une même turbidité se retrouve dans le 4^e tube de la série d'un sérum à examiner représentant 1/16 de ml de la dilution 1/250 de ce sérum, nous pourrions dire que 1/6,7 de ml de sérum étalon d'une part et 1/16 de ml de sérum à étudier d'autre part ont neutralisé la quantité de hyaluronidase supérieure à une unité, qui se trouvait en leur présence.

Cette quantité de hyaluronidase étant identique dans les deux cas, nous pourrions dire que 1/16 de ml de sérum à étudier et 1/6,7 de sérum étalon, l'un et l'autre dilué au 1/250, ont neutralisé la même quantité de hyaluronidase, donc que le sérum à étudier possède une teneur en anti-hyaluronidase correspondant à $16/6,7 = 2,38$, soit deux, trente-huit fois la teneur du sérum étalon.

Dans le cas où aucun tube de la série étalon ne correspondrait à la turbidité de référence, on peut déterminer la dilution théorique correspondant à cette turbidité. On peut également admettre comme repère non pas la turbidité de référence, mais une turbidité voisine qui correspond à une zone où, pour le réactif sérique utilisé, la turbidité est proportionnelle à la quantité d'acide hyaluronique non dépolymérisé présente dans le mélange réactionnel.

C. — Mode opératoire suivi dans ce travail

L'un des buts de ce travail étant la comparaison des résultats obtenus en suivant soit la technique A.H., soit la technique S.E., nous avons suivi un mode opératoire qui nous permet de calculer et d'exprimer nos résultats selon les modalités propres de l'une et l'autre de ces techniques. C'est-à-dire que nous avons suivi la technique S.E. en y adjoignant une galerie destinée à titrer la hyaluronidase comme dans la technique A.H.

L'ensemble des opérations est schématisé dans le tableau récapitulatif (fig. n° 2).

Ce schéma est un schéma type qui fut établi a priori, d'après les techniques utilisées pour des dosages d'anticorps voisins. Mais il est possible que des variations dans les conditions expérimentales, dans le cas particulier du dosage de l'antipneumohyaluronidase, permettent d'obtenir des résultats plus précis. C'est ce que nous allons étudier dans les chapitres suivants, après quoi il nous faudra décider d'une technique définitive en tenant compte d'une part des facteurs les plus favorables à ce dosage particulier des antipneumohyaluronidases et d'autre part de notre désir d'unifier le plus possible le dosage des antihyaluronidases correspondant aux enzymes d'origines bactériennes différentes.

SCHEMA GENERAL

I. — TITRAGE DES SERIES ETALON.

1. Dilution du sérum étalon.

Tubes N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
SÉRUM ÉTALON (au 1/250)	0,50ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml à rejeter
TAMPON 1		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
SOIT QUANTITÉ DE SÉRUM ÉTALON (1/250)	0,50	0,33	0,22	0,15	0,10	0,066	0,044	0,030	0,020	0,015

2. Ajouter dans tous les tubes : 0,50 ml de pneumohyaluronidase (x % de façon à avoir environ 2 unités par 0,50 ml).
3. Laisser 24 heures à la température du laboratoire.
4. Ajouter : 0,50 ml de solution d'acide hyaluronique à 0,05 % dans tous les tubes.
5. Laisser au bain-marie 37° pendant 30 minutes.
6. Ajouter dans tous les tubes, soit :
 - 4 ml de réactif sérique normal
 - 2 ml de réactif sérique double

II. — VERIFICATION DE LA PNEUMOHYALURONIDASE.

Tubes N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Pneumo Hyaluronidase à 2 unités / 0,50 ml	0,50	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10
Tampon I en q.s.p. 1ml soit	0,50	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90

Puis continuer comme ci-dessus par les étapes 2), 3), 4), 5) et 6).

III. — TITRAGE DES SERUMS SUJETS.

1. Dilution des sérums sujets.

Tubes N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Sérum sujet (à 1/250)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50 à rejeter
Tampon I		0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
Soit : quantité de Sérum sujet (1/250) par tube	0,50	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001

Puis continuer comme en I par les étapes 2), 3), 4), 5) et 6).

Remarque :

- Pour opérer suivant la méthode A.H., nous utilisons les paragraphes III et II.
- Pour opérer suivant la méthode S.E., nous utilisons les paragraphes III et I.

Fig. 2

CHAPITRE III

INFLUENCE DES MODIFICATIONS DE TEMPERATURE ET DE DUREE D'ACTION DES DIFFERENTS REACTIFS

A. — Au stade de la fixation antigène-anticorps

Parmi les facteurs influant sur les réactions enzymatiques et la neutralisation des enzymes par une antienzyme, la durée de la réaction et la température du milieu réactionnel sont particulièrement importantes. La plupart des méthodes préconisent de laisser en contact enzyme et substrat durant une période de l'ordre de 30 à 60 minutes et à la température de 37°. Par contre, on constate une variété beaucoup plus grande dans la réalisation de la neutralisation enzyme-antienzyme. Dans la technique de Faber qui nous sert de référence (6, 7, 8), la neutralisation de la streptohyaluronidase par l'antistreptohyaluronidase s'accomplit à la température du laboratoire, environ 18°, et durant 24 heures. La température de 18° est conservée dans la technique de titrage de ces mêmes antistreptohyaluronidases de T.N. Harris et S. Harris (9, 10), mais la durée est réduite à 15 minutes. Pour d'autres anticorps, ces données varient : la technique de l'Institut Pasteur de Paris pour les antistreptolysines, dérivée de celle de Todd et Kalbach, laisse en présence antienzymes et enzymes 15 minutes à 37°.

La plupart des techniques de dosage des antistaphylolysines se contentent d'un contact de 15 minutes à la température ordinaire. Dans la technique de dosage des antistreptokinases de A. Bertoye, M. Carraz, P. Detolle (2), on admet une neutralisation quasi immédiate à 0°.

INFLUENCE DU TEMPS D'ACTION ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA RÉACTION
ANTIGÈNE - ANTICORPS

DURÉE DE NEUTRALI- SATION	TITRE DE LA PNEUMO- COCCUS (en unités par 0.5 ml)	SÉRUM DU ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS SUJETS :				TITRE DE LA PNEUMO- COCCUS (en unités par 0.5 ml)	SÉRUM DU ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS SUJETS											
			TECHNIQUE A. H.						TECHNIQUE S. E.				TECHNIQUE A. H.				TECHNIQUE S. E.			
			W	X	Y	Z			W	X	Y	Z	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
24 H.								2.4	1040	9360	3150	44.570	4180	9	3	14	4.			
16 H.								2.1	850	6410	2130	72900	3140	7.5	2.5	14	3.8			
8 H.								2.4	650	4885	4710	7220	2410	7.5	2.5	13	3.5			
5 H.								2.5	510	3620	990	6200	1490	7	2	12	3			
3 H.								2.4	390	2280	730	3810	1010	6	2	10	2.7			
1 H.								2.3	300	1290	585	2820	880	4.5	2	9.5	2.9			
Température : 37°																				

Fig. 3. Température du laboratoire

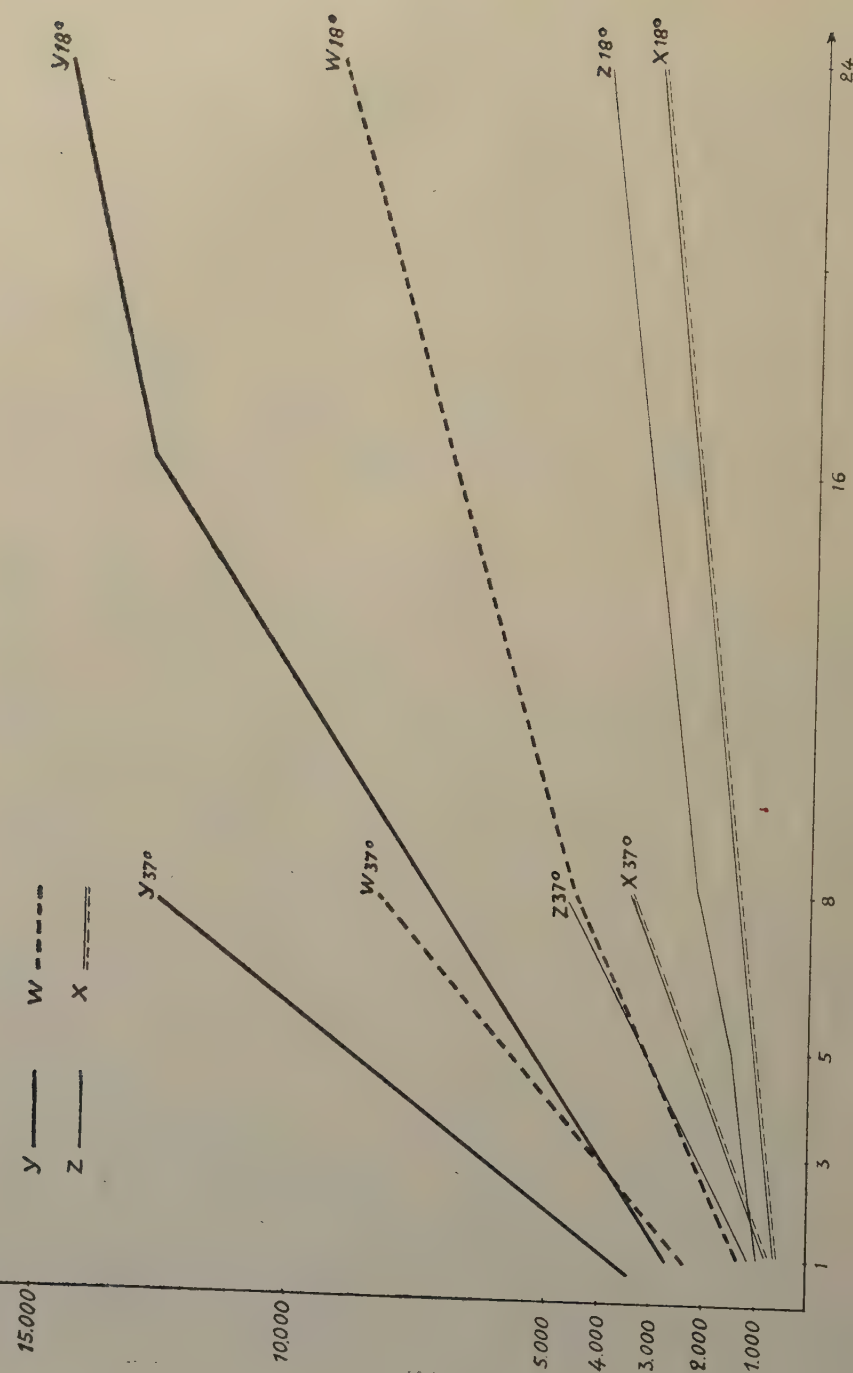
L'intérêt de la neutralisation prolongée à 18° durant 24 heures, préconisée pour les antistreptohyaluronidases par V. Faber, résulte de la constatation suivante : V. Faber détermine (6, 8) l'activité antistreptohyaluronidasique de sérums après des temps de combinaison avec l'enzyme variant de 2, 4, 8, 16, 24, 48 heures, il trouve que l'activité maximum est atteinte pour des durées variables selon les sérums, et de toute façon toujours en 24 heures. Cette « avidité » neutralisante plus ou moins importante des sérums (notions que Faber reprend après les travaux de Werne en 1951 sur la toxine diphtérique) est fonction de la plus ou moins grande évolutivité des processus qui ont donné naissance aux antienzymes. L'utilisation d'une technique adoptant une neutralisation prolongée de l'enzyme permet donc non seulement de mesurer le pouvoir inhibiteur total du sérum, mais encore éventuellement la rapidité avec laquelle ce pouvoir total est atteint.

Nous avons conduit nos expériences de la façon suivante : nous avons utilisé d'une part notre sérum étalon, d'autre part 4 sérums de sujets divers. Nous avons fait des dilutions de ces sérums selon la technique générale décrite au chapitre précédent et dans chaque tube nous avons ajouté une quantité de hyaluronidase pneumococcique correspondant à 2,5 unités environ. Dans un premier groupe d'expériences nous avons fait varier la durée de neutralisation : 1, 3, 5, 8 heures, en maintenant la température à 37°. Nous avons mis en route cette incubation à des heures différentes de façon à ce que l'action enzymatique de l'enzyme non neutralisée sur le substrat ait lieu à peu près au même moment (les bains-maries cependant étant différents selon ces séries). Dans un deuxième groupe d'expériences, nous avons procédé de même avec des durées de neutralisation de 1, 3, 5, 8, 16, 24 heures, la température étant de 18-20°.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau (fig. 3) et représenté sur les courbes correspondantes de la fig. 3^{bis}. On constate que le titre de la hyaluronidase mesuré pour chaque série est relativement constant. Alors que la quantité théorique d'unités contenues dans les 0,5 ml employés pour chaque tube devait être de 2,5, elle était en réalité de 2,3 à 2,8. La valeur moyenne obtenue dans l'ensemble des 10 séries étant de 2,43, l'écart ne dépasse pas $\pm 15\%$ et même, pour huit de ces dix séries, $\pm 5\%$. Ceci permet notamment de conclure — point sur lequel nous reviendrons ultérieurement — que la hyaluronidase n'a rien perdu de son activité malgré un séjour à 18° s'étendant jusqu'à 24 heures, et à 37° jusqu'à 8 heures.

A Unités

Y ———
Z ———
W - - - -
X - - - -



Comme nous l'avions indiqué dans le chapitre précédent, nos résultats sont exprimés d'une part en unités, d'autre part en multiple du taux trouvé dans un sérum considéré comme étalon.

Les résultats dans le cas des neutralisations réalisées à la température du laboratoire sont résumés dans la partie droite de ce tableau (fig. 3). On voit que la neutralisation par l'anticorps est progressive et que les taux en unités des sérums augmentent jusqu'à 24 heures de neutralisation, rien ne prouvant d'ailleurs que, au terme de cette période, la neutralisation soit complète. Dans l'ensemble, cette progression est assez régulière (alors que dans les exemples donnés par V. Faber dans le cas des taux d'antistreptohyaluronidase des sérums, cette progression était surtout rapide dans les premières heures, puis nettement plus faible ou nulle après la 8^e heure).

La neutralisation est beaucoup plus rapide lorsque, au lieu de s'effectuer à 18°, elle s'effectue à 37° (partie gauche du tableau, fig. 3). Après 8 heures à 37°, la neutralisation est de l'ordre de celle constatée après 24 heures à 18°. On peut de même comparer grossièrement les résultats obtenus en 5 heures à 37° et en 16 heures à 18°.

De ces faits, résulte la nécessité, si l'on veut obtenir des résultats constants, de respecter scrupuleusement les durées et la température de neutralisation fixées par la technique.

Par contre, exprimés par rapport à un sérum étalon, ces résultats apparaissent beaucoup plus constants quelles que soient la température et la durée de neutralisation. La constance, malgré les variations de durée de neutralisation, est surtout remarquable lorsqu'on opère à 37°. Quand on opère à 18°, par contre, on constate que par rapport au sérum étalon, les sérums sujets ont tendance à se montrer de plus en plus forts alors que la neutralisation se prolonge ; tout se passe comme si l'« avidité » du sérum étalon était plus grande que celle des sérums sujets. Les écarts sont surtout importants entre les résultats obtenus à la première heure, voire à la 3^e, et les résultats correspondant à une neutralisation plus prolongée.

A 37°, au contraire, il semble que les temps de neutralisation importent peu : nous avons vu qu'à cette température la neutralisation est plus rapide, aussi ne saisissons-nous pas à cette température (même pour une neutralisation d'une heure seulement) le début de la neutralisation qui permettait, à 18°, d'apercevoir des différences d'« avidité ».

Si, dans la technique A.H. exprimant les résultats en unités, il était nécessaire de fixer avec précision la durée et la température de neutralisation, une latitude beaucoup plus grande est permise dans une technique exprimant les résultats par rapport à un sérum étalon : il suffit que la neutralisation s'étende sur 3 heures à 37° et 5 heures à 18° pour que les résultats deviennent à peu près constants. Ce point de vue ne saura cependant être admis sans restriction qu'après une vérification sur de nombreux sérums afin d'être assuré qu'une telle neutralisation permet bien de supprimer les différences d' « avidité ».

B. — Au stade de l'action enzymatique

L'étude de l'influence des modifications de température et de durée de réaction au stade de neutralisation enzyme-antienzyme nous a montré que, en dépit de larges variations de température (de 18 à 37°) et de durée (de 1 h. à 24 heures), la hyaluronidase ne subissait pas d'altération.

Nous nous attacherons dans les expériences suivantes à étudier l'influence de ces deux facteurs (temps et température) sur la réaction enzyme-substrat. Dans toutes les expériences conduites selon notre schéma général exposé dans la fig. 2, nous avons réalisé la neutralisation habituelle de 24 heures à 18°.

Avant d'entreprendre des expériences selon ce schéma et comportant l'étude comparative de sérum étalon et de sérums sujets, il nous a fallu procéder à des expériences complémentaires : en effet, l'unité de hyaluronidase a été définie comme la quantité d'enzyme qui, en 30 minutes à 37°, détruit la moitié de 0,250 mg d'acide hyaluronique. Nous avons admis comme dose constante de hyaluronidase dans chaque tube contenant des quantités variables de sérum, une quantité de hyaluronidase représentant 2 unités à 2 unités 5 sous le volume de 0,50 ml. Il est bien évident que si cette quantité de hyaluronidase agit non plus 30 minutes, mais 1 heure ou 3 heures, elle détruira plus d'acide hyaluronique, et correspondra par exemple à une activité non plus de 2 unités, mais de 5 ou 15 unités. Par conséquent, il faudra 4 ou 14 fois plus de sérum pour neutraliser la hyaluronidase en ne laissant que l'unité qui permettra d'obtenir la « demi-turbidité » avec le réactif sérique.

Par contre, si cette même quantité de hyaluronidase n'agit plus que 20 minutes ou 10 minutes et à une température inférieure à 37°,

ACTION ENZYME - SUBSTRAT : VARIATIONS EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE

(TITRAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE)

DURÉE D'ACTION DE L'ENZYME	TITRE DE LA HYALURONIDASE (exprimé en unités par 0,50 ml α		DURÉE D'ACTION DE L'ENZYME SUR LE SUBSTRAT	TITRE DE LA HYALURONIDASE (exprimé en unités par 0,50 ml α									
	37°	18°		43°	41°	39°	37°	31°	23°	14°	6°-8°	0°	
5 HEURES	> 10 UNITÉS	10 UNITÉS	30 MINUTES	2,5	2,1	2,1	2	2	0,83	0,55	0	0	
3 HEURES	10 "	3,6 "											
1 HEURE	5 "	2 "											
30 MINUTES	2 "	1 "											
15 MINUTES	1,25 "	0,5 "											
5 MINUTES	0	0											

Fig. 4

Fig. 4

INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA RÉACTION

ENZYME - SUBSTRAT (Dosage des Sérums)

DURÉE D'ACTION ENZYME SUBSTRAT	TITRE RÉEL DE LA HYALU- RONIDASE	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS-SUJETS							
			PAR RAPPORT A L'ACIDE HYALURONIQUE (Technique A. H.)				PAR RAPPORT AU SÉRUM ÉTALON (Technique S. E.)			
			W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
3 h.	10 u	20.000	140.100	39.850	240.000	99.700	7	2	11,5	2,5
30 min.	2 u	980	7.410	2.340	11.500	2.720	8	2,5	12,4	2,9
15 min.	1,2 u	380	3.450	1.140	5.120	1.230	9	3	13,5	3,2
TEMPÉRATURE : 37°										

Temps de Neutralisation Antigène-Anticorps : 24 heures
à la température du laboratoire

Fig. 5

INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA RÉACTION

ENZYME - SUBSTRAT (Dosage des Sérums)

DURÉE D'ACTION ENZYME SUBSTRAT	TITRE RÉEL DE LA HYALU- RONIDASE	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS-SUJETS							
			PAR RAPPORT A L'ACIDE HYALURONIQUE (Technique A. H.)				PAR RAPPORT AU SÉRUM ÉTALON (Technique S. E.)			
			W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
3 h.	3,4 u	1.520	11.750	3.950	20.420	4.250	7,5	2,5	13	2,7
30 min.	1 u						6,9	2,5	12,5	3
15 min.	0,5 u									
TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE										

Durée de Neutralisation Antigène-Anticorps : 24 heures
à la température du laboratoire

Fig. 6

l'activité risque de ne représenter même plus une unité. Dans ces conditions, il sera donc impossible d'effectuer toute mesure d'activité antienzyme dans un sérum : même sans sérum on ne pourra détruire assez d'acide hyaluronique pour abaisser la turbidité par addition de réactif sérique jusqu'à la turbidité de référence.

Nous avons donc exécuté les expériences complémentaires suivantes. La solution d'enzyme établie pour l'ensemble de ce groupe d'expériences, et telle qu'elle devrait titrer normalement de 2 à 2,5 unités, fut soumise aux traitements suivants : 12 séries furent établies, comportant 1, 0,95, 0,90, 0,85, ... 0,05 ml d'enzyme. Ces séries, correspondant aux séries de « titrage de la hyaluronidase » de la technique standard, furent laissées en contact avec le substrat 5, 15, 30 minutes, 1, 3, 5 heures, ceci à 37° d'une part, et à 18° d'autre part. 9 autres séries furent également établies, qui demeurèrent 30 minutes en contact avec le substrat, mais aux températures suivantes : 43°, 41°, 39°, 37°, 31°, 23°, 14°, 6°, 0°.

Dans ces conditions, l'activité représentée par 0,50 ml de la solution de hyaluronidase est décrite dans le tableau de la fig. 4. On constate que, en faisant varier la durée d'action et en comparant l'activité d'une part à 37°, d'autre part à 18°, des durées de 15 minutes à 37° et de 30 minutes ou 1 heure à 18°, sont les limites inférieures au-dessous desquelles on ne peut descendre. On constate en outre que la différence d'activité entre les températures de 37° et de 18° est certes importante, mais moins qu'on ne pourrait le supposer à première vue, très grossièrement on peut dire que la dégradation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase pneumococcique exige deux fois plus de temps à 18° qu'à 37°, toutes choses égales par ailleurs.

Cette expérience préliminaire achevée, nous nous sommes efforcés de réaliser quelques dosages complets avec sérum étalon et différents sérums sujets pour quelques temps d'action à 18° et à 37°. Pour tous ces dosages la neutralisation anticorps antigène fut effectuée à 18° durant 24 heures. Les résultats sont consignés dans le tableau des figures 5 et 6.

*INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA RÉACTION
ENZYME - SUBSTRAT*

<i>TEMPÉRATURE D'INCUBATION ENZYME-SUBSTRAT</i>	<i>TITRE RÉEL DE LA HYALURONIDASE</i>	<i>TAUX D'UN SÉRUM ÉTALON</i>	<i>TAUX DES SÉRUMS SUJETS</i>							
			<i>PAR RAPPORT À L'ACIDE HYALURONIQUE (TECHNIQUE A. H.)</i>				<i>PAR RAPPORT AU SÉRUM ÉTALON (TECHNIQUE S. E.)</i>			
			W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
41°	2,1	1.100	9.250	4.050	15.900	4.120	9	4	16	4
37°	2	950	7.150	2.880	12.550	3.050	7,5	3	13,2	3,2
32°	1,9	750	6.000	2.230	10.350	2.650	8	3	13,9	3,5
22°	0,9									

*TITRAGE DU SÉRUM ÉTALON ET 4 SÉRUMS SUJETS
NEUTRALISATION ANTIGÈNE - ANTICORPS : 24 heures à la température
du Laboratoire
TEMPS D'ACTION ENZYME - SUBSTRAT : 30 MINUTES
Fig. 7*

On constate qu'aucune expression en unité (Technique A.H.) ne donne de résultats comparables d'une série à l'autre. Plus la valeur réelle en unité de la quantité d'enzyme employée est importante, plus la teneur en anticorps du sérum apparaît élevée.

Par contre, dans l'expression des résultats par rapport au sérum étalon, on constate qu'une bonne concordance se manifeste d'une série à l'autre, puisque les valeurs moyennes pour les sérums W, X, Y, Z sont, dans les cinq expériences, mesurables : (W) 7,7 ; (X) 2,5 ; (Y) 12,6 ; (Z) 2,86 et que les valeurs trouvées sont toujours dans une limite de $\pm 20\%$ par rapport à ces moyennes, et le plus souvent dans une limite de $\pm 10\%$.

En particulier dans l'expérience conduite à 18° pour une action enzymatique de 30 minutes, où l'activité de la hyaluronidase ne dépasse pas 1 unité, ces résultats sont ininterprétables par la technique A.H. Au contraire la comparaison des chiffres de lecture turbidimétrique obtenus dans les séries sujets et étalons selon la technique S.E. permet d'obtenir des résultats ne s'écartant pas de $\pm 10\%$ de la moyenne générale des expériences.

Le tableau de la fig. 5 nous a montré que pour une durée d'action de 30 minutes des variations de température entre 43° et 31° n'entraînent pas de différences considérables dans les résultats, puisque la même quantité d'enzyme représente 2,5 unités d'activité à 43° et 2 à 31° .

Nous avons dosé nos mêmes sérums W, X, Y, Z, vis-à-vis du sérum étalon, en opérant à 41° , à 37° , à 32° , la durée d'action enzymatique étant de 30 minutes, la neutralisation antigène-anticorps étant réalisée à la température du laboratoire durant 24 heures.

Les résultats sont consignés dans le tableaux de la fig. 7. Bien que la différence d'activité réelle de la quantité d'enzyme employée soit minime : 2,1 unités à 41° , 2 à 37° , 1,9 à 32° , on constate encore, de même que dans le paragraphe précédent, que les taux des sérums exprimés par rapport à l'unité de hyaluronidase sont d'autant plus élevés que l'activité réelle de la hyaluronidase est plus grande et d'une façon générale, comparés entre eux, les taux obtenus à 41° et à 32° sont dans le rapport de 2/3.

Par contre, calculés par rapport au sérum étalon (technique S.E.) les taux des sérums W, X, Y, Z sont presque identiques, que la température choisie soit 41° ou 32° les écarts par rapport aux valeurs

moyennes n'excèdent pas 20 % et demeurent, dans la presque totalité des cas, inférieurs à 10 %.

En conclusion, nous insistons sur la nécessité de respecter scrupuleusement les durées et les températures choisies pour les différents stades des opérations si l'on adopte la technique A.H. Par contre une latitude plus grande est possible si l'on adopte la technique S.E.

Au total, 8 mesures ont été faites pour chacun des sérums W, X, Y, Z, la moyenne des taux (par rapport au sérum étalon) étant pour W de 7,8, pour X de 2,8, pour Y de 13,25 pour Z de 3,12 fois le taux moyen du sérum étalon ; les écarts extrêmes sont de ± 15 % pour W, ± 40 % pour X, ± 20 % pour Y et ± 30 % pour Z.

Les écarts extrêmes sont plus importants quand les taux sont plus bas et de ce fait les mesures sont plus imprécises. Ces écarts de 30 % et de 40 % sont d'ailleurs exceptionnels puisqu'ils ne se retrouvent qu'une seule fois pour 40 % (une mesure de X) et 2 fois pour 30 % (une mesure de X et une Z).

Au total sur les 32 mesures effectuées (8 par sérum), 27 (soit 84 %) sont dans un écart de ± 15 % par rapport à la moyenne, 29 (soit 90 %) dans un écart de ± 20 % et 31 (97 %) dans un écart de ± 30 %.

C. — Au stade de lecture turbidimétrique après addition du réactif sérique

L'influence de la température sur le dernier stade de la réaction (détermination de l'acide hyaluronique non dépolymérisé par le réactif précipitant, en l'occurrence le réactif sérique) est un problème à priori indépendant de l'origine bactériologique de la hyaluronidase. En fait l'expérience, que nous avons au laboratoire, des hyaluronidases testiculaires, streptococciques, staphylococciques, pneumococciques, nous a permis de constater que la présence dans le milieu réactionnel de l'une ou l'autre de ces enzymes n'influe en rien sur la précipitation finale.

Cependant dans l'étude complète de la réaction du dosage de la hyaluronidase, on peut se demander si la valeur de la température, au moment où l'on ajoute le réactif sérique, si la période plus ou moins prolongée (et la température du milieu durant cette période) s'écoulant entre l'addition du réactif et la lecture photométrique, n'interviennent pas sur la lecture photométrique finale.

Ce point a été étudié au cours d'un travail en cours, au laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon, sur les hyaluronidases staphylococciques. Nous citerons les conclusions de quelques unes de ces expériences : Le réactif sérique étant ajouté, sitôt le tube sorti du bain-marie, la lecture turbidimétrique est répétée 4, 15, 30 minutes et 2 heures après cette addition : les modifications de la turbidité sont peu appréciables et le calcul du taux des antistaphylohyaluronidases de quelques sérums par rapport à un sérum étalon ne donne pas de différence, que les lectures soient pratiquées 5 minutes ou 2 heures après l'addition de réactif sérique.

D'autres essais furent faits en ajoutant le réactif sérique, les tubes demeurant au bain-marie un temps variable après cette addition ; ces temps variables furent dans nos expériences de 20, 40 et 60 minutes. On constate que par rapport à la turbidité lue sitôt après addition du réactif sérique, la turbidité des tubes demeurés au bain-marie croît légèrement. Cet accroissement porte d'ailleurs aussi bien sur les tubes témoins contenant seulement l'acide hyaluronique et le réactif sérique que sur ceux des séries de dosage contenant sérum, hyaluronidase, acide hyaluronique et réactif sérique.

Pour fixer l'ordre de grandeur de cet accroissement, nous indiquerons que la turbidité du tube contenant 0,125 mg d'acide hyalu-

ronique était de 0,160 (en D.O.) quelques minutes après l'addition de réactif sérique ; elle passait à 0,190 après maintient au bain-marie durant 20 minutes : à 0,205 après 40 minutes et à 0,215 après 60 minutes. Une fois sortis du bain-marie les tubes ne présentent plus de variations sensibles de leur turbidité. Les taux des sérums sujets calculés, après ces divers traitements, par rapport à un sérum étalon ne subissent aucune modification.

Du point de vue pratique il semble qu'il y ait 2 modes opératoires possibles découlant de ces expériences, en admettant que l'on effectue des séries d'environ 150 à 200 tubes, pour lesquelles l'addition de réactif sérique demande approximativement 15 à 20 minutes. Il faut : soit ajouter le réactif sérique en sortant le tube du bain-marie exactement 30 minutes après l'addition dans ce tube d'acide hyaluronique (ou après le temps choisi pour cette action enzymatique), soit ajouter le réactif sérique dans le bain-marie et laisser les tubes au bain-marie une heure au moins avant de les retirer tous ensemble (le 1/4 d'heure de différence de maintien à 37° après l'addition de réactif sérique perdant son importance en fonction de la longue durée totale de maintien au bain-marie) ; les tubes permettant d'établir la turbidité de référence, les séries de titrage de la hyaluronidase et les séries de sérum étalon sont soit mis au milieu des autres, soit, si l'on fait en double les séries précitées, placées l'une avant l'autre après les séries sujets, la valeur moyenne entre les deux étant retenue pour les calculs.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DES QUANTITES DE REACTIFS EN PRESENCE

Dans le chapitre précédent nous avons étudié l'influence des facteurs « Temps d'action » et « Température » sur la réaction de titrage des sérums. Ici nous nous attacherons au problème, moins important d'ailleurs, de la variation de la quantité des réactifs en présence.

A. — Variations des quantités globales de tous les réactifs

Nous avons vu, dans notre introduction, que nous voulons mettre au point une méthode essentiellement pratique, susceptible de permettre des dosages en grande série. Pour cela nous utilisons une pipette automatique, le rhéomètre. Lorsqu'on veut régler le rhéomètre pour une contenance exacte, on est parfois conduit à une manœuvre un peu longue. La simple vérification de l'exactitude de cette contenance avant chaque dosage est une manœuvre nécessaire mais fastidieuse. Or tous les réactifs (sauf le réactif sérique qui n'intervient pas dans la réaction de neutralisation antigène-anticorps et la réaction enzymatique proprement dite) sont utilisés sous le même volume de 0,50 ml ; on peut donc se demander si, le rhéomètre étant réglé en principe pour une contenance de 0,50 ml, une variation de ce volume affecterait la précision des résultats, le même rhéomètre étant bien entendu employé pour tous les dosages et aucun dérèglement ne se produisant au cours de ceux-ci.

Cela revient à vérifier expérimentalement si, la quantité globale des réactifs variant mais les proportions restant constantes, les résultats demeurent identiques. A priori, ce fait paraît évident, puisque les proportions relatives des réactifs demeurent constantes.

Pour notre étude nous avons réglé exactement le rhéomètre à 0,65 ml puis à 0,50 ml enfin à 0,35 ml (une variation de $\pm 30\%$ due à un dérèglement de l'appareil n'ayant d'ailleurs aucune chance de se produire).

Le tableau de la fig. 8 montre que les résultats, calculés soit par la méthode A.H., soit par la méthode S.E., ne subissent pratiquement pas de variations.

VARIATION DES QUANTITÉS GLOBALES
DES RÉACTIFS

TITRE DE LA PNEUMO- HYALURONIDASE (pour 0,50 ml à 2,5% exactement mesuré)	VOLUME DU RHÉO- MÈTRE	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS-SUJETS							
			Technique A. H.				Technique S. E.			
			W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
2,05	0,50 ml	950	8.500	2.900	13.400	4.000	9	3	14,1	4,2
2	0,65 ml	930	8.460	2.800	12.910	3.740	9,1	3	13,8	4
2,1	0,35 ml	1.050	8.950	3.040	14.750	4.500	8,5	2,9	14	4,3

Fig. 8

**B. — Variation du titre
de la pneumohyaluronidase employée**

Une deuxième question se pose : savoir si, dans le cas où des variations se produiraient sur un seul réactif, les résultats demeureraient constants. C'est ce qui se passe en pratique lorsqu'on emploie une hyaluronidase plus ou moins concentrée par exemple, le volume de 0,50 ml correspondant alors à une plus ou moins grande activité enzymatique. Ce cas est particulièrement important, car indépendamment des variations d'activité résultant des variations de température et de temps d'action étudiées précédemment, des variations d'activité peuvent se produire en fonction d'une plus ou moins bonne conservation de la hyaluronidase.

Nous avons donc préparé les solutions de hyaluronidase suivantes, plus ou moins concentrées :

Solution du bouillon initial dit : « Hyaluronidase Mère » diluée à :

- 1 % : solution « a »,
- 1,7 % : solution « b »,
- 2,5 % : solution « c »,
- 3,2 % : solution « d »,
- 4 % : solution « e »,

la solution « c » à 2,5 % correspond à celle habituellement utilisée et titre, dans les conditions normales d'emploi, 2 unités pour 0,50 ml, les autres se trouvant par rapport à celle-là dans des concentrations proportionnelles de 0,4, 0,7, 1,3 et 1,6.

Une expérience préliminaire nous a montré que l'activité réelle présentée par 0,50 ml de ces diverses solutions était de :

— 0,8 unités pour la solution « a » (la solution « a » étant de 2,5 fois moins concentrée que la solution « c ») ;

— 2 unités pour la solution « c » ;

— 3,3 unités pour la solution « e » (étant de 1,6 fois plus concentrée que la solution « c »).

Ce qui correspond très bien aux rapports de concentration de ces diverses solutions avec la solution « c ».

Il était donc inutile d'essayer d'employer la solution « a » dont 0,50 ml ne contenait même pas une unité.

Des séries de sérums W, X, Y, Z ont été titrées avec les solutions « b », « c », « d », « e ». Les résultats sont résumés dans le tableau de la figure 9.

Dans ces dosages nous avons retrouvé : la même valeur pour l'activité de 0,50 ml de hyaluronidase que celle trouvée dans notre expérience préliminaire pour les solutions « c » et « b » ; pour la solution « d » 2,6 unités, valeur concordant très bien avec le chiffre théorique ; et une valeur en mauvaise concordance avec le chiffre théorique pour la solution « b » (1 unité, alors que le rapport des concentrations en enzyme des solutions « b » et « c » laissait prévoir une valeur de 1,4 unité pour 0,50 ml de « b »). Dans ce cas aucun calcul selon la méthode A.H. n'a été possible. Les autres séries de

VARIATIONS DES TITRES DE LA HYALURONIDASE EMPLOYÉE

SOLUTION D'HYALURONIDASE UTILISÉE SÉRIE ET INDICATIF DE	TITRE RÉEL - DE LA HYALU- RONIDASE (en unités par 0,50 ml de solution utilisée)	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS SUJETS									
			TECHNIQUE A.H.					TECHNIQUE S.E.				
			W	X	Y	Z		W	X	Y	Z	
10% "a"	0,8					TITRAGE		IMPOSSIBLE				
1,7% "b"	1							11	4,2	16,5	4,7	
2,5% "c"	2	1040	8330	2600	15830	4030						
3,2% "d"	2,6	1120	8900	3370	15980	4120						
4% "e"	3,3	1170	10210	4050	17100	4690						

Fig. 9

dosage ont montré que les taux d'anticorps, calculés selon la méthode A.H., étaient de plus en plus élevés à mesure que la concentration en hyaluronidase des solutions employées était plus grande, variations qui peuvent s'expliquer du fait que les proportions relatives d'enzyme et de substrat ne sont pas les mêmes dans ces trois séries.

Calculant selon la méthode S.E., nous avons pu obtenir des résultats pour la série de dosage utilisant la solution « b ». Certes, ces résultats ne sont pas en accord parfait avec ceux des dosages obtenus par la même méthode S.E. et utilisant les solutions « c », « d » et « e ». Les résultats de ces trois dernières séries se trouvent dans les limites d'erreur constatées au cours du chapitre précédent et nous pouvons donc dire que des variations importantes de la teneur en pneumohyaluronidase n'entraînent pas de conséquence notable sur les titres des sérums calculés selon la méthode S.E., lorsqu'il reste un excès suffisant de hyaluronidase après neutralisation par l'anti-enzyme.

Quant aux dosages de la série « b », ininterprétables par la méthode A.H., ils permettent, quoiqu'avec difficulté, un calcul de résultats par la méthode S.E., résultats qui, tout en s'écartant notablement de ceux des séries « c », « d » et « e », sont cependant cliniquement fort satisfaisants.

C. — Variation de la dilution des sérums

Remarquons cependant que d'une façon générale il est préférable d'utiliser une solution de hyaluronidase trop concentrée plutôt qu'une solution trop faible, afin d'éviter de tomber au-dessous du seuil de 1-unité pour 0,50 ml de solution de hyaluronidase.

Un autre point à considérer est l'influence de la dilution de sérum. En effet dans le sérum, l'antihyaluronidase est accompagnée des divers constituants sériques. Soient deux sérums de titres en anti-pneumohyaluronidase très éloignés : dans les tubes correspondant à la demi-turbidité il y a bien la même quantité d'inhibiteur d'enzyme, mais les constituants normaux du sérum dans les deux tubes sont en quantités très différentes, puisqu'il a fallu diluer beaucoup plus le sérum le plus fort pour arriver à ce résultat : on peut se demander si ces différences en constituants sériques n'influent pas sur le résultat et si l'inhibition de l'enzyme n'est pas la résultante de deux composantes, l'antienzyme spécifique d'une part et d'autre part la plus ou moins grande quantité des constituants sériques normaux en présence. (Bien entendu dans cette étude nous ne faisons par inter-

venir les constituants sériques en quantités anormales ou des constituants sériques occasionnels dont le rôle peut être certainement important ; rappelons à ce sujet la cause d'erreur due à un excès de cholestérol pour les dosages d'antistreptolysines.)

Nous avons, dans cette étude de l'influence des constituants sériques, expérimenté seulement sur le sérum étalon.

Le sérum étalon est dilué aux taux suivants : 1/500, 1/400, 1/300, 1/250, 1/200, 1/150, 1/100, 1/50. En présence de 0,50 ml de ces solutions de sérum étalon, on met des quantités variables de pneumohyaluronidase de façon que, après neutralisation, il reste une quantité à peu près constante d'enzyme non neutralisée. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

DILUTION DU SÉRUM ÉTALON	1/500	1/400	1/300	1/250	1/200	1/150	1/100	1/50
Taux obtenus (en unités par ml de sérum pur) .	995	990	1.050	1.020	1.210	1.200	1.290	1.405

De ces résultats nous pouvons tirer les conclusions suivantes : quand le sérum est faiblement dilué le taux d'anticorps apparaît plus fort que quand le sérum est plus fortement dilué. Donc les constituants sériques jouent un rôle certain dans la neutralisation de l'enzyme. Mais le taux d'anticorps semble se stabiliser à partir de la dilution au 1/250 : en effet entre 1/250 et 1/500 nous n'avons trouvé que de très faibles différences.

Or notre dilution de base est au 1/250. Dans le cas de sérums plus forts nous aurons des dilutions encore plus importantes et l'influence des facteurs sériques sera de ce fait éliminée.

Ces faits sont à rapprocher de ceux que nous étudions dans le chapitre suivant : quand on opère en milieu trop riche en ions, l'activité de la hyaluronidase diminue ; il est donc normal que, aux faibles dilutions, les éléments salins du sérum jouent un rôle inhibiteur sur l'action de l'enzyme sur le substrat, et augmentent à tort le titre apparent du sérum en taux d'antihyaluronidase.

En résumé on peut conclure de ce chapitre que : en utilisant la méthode S.E., avec des sérums dilués au moins 1/250, on peut fort bien négliger un réglage précis du rhéomètre d'une part, et d'autre part le titrage précis de la pneumohyaluronidase, à condition toutefois que celle-ci soit présente en quantité supérieure à une unité.

CHAPITRE V

INFLUENCE DU MILIEU REACTIONNEL

Au cours des réactions de neutralisation et d'action de l'enzyme sur le substrat, le milieu réactionnel est constitué par les trois éléments suivants : le tampon diluant les autres éléments, le bouillon de culture renfermant la hyaluronidase, le sérum contenant l'antienzyme.

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que, aux dilutions utilisées, l'influence des éléments du sérum autres que l'antienzyme était pratiquement négligeable.

Le bouillon de culture renfermant de la pneumohyaluronidase, la nature et la quantité des sels composant le tampon peuvent intervenir dans la réaction. Ce sont ces influences que nous allons étudier dans ce chapitre.

A. — INFLUENCE DU TAMPON UTILISE

I. — Tampon acéto-acétique

C'est celui qui est généralement utilisé dans les techniques de dosage de l'antihyaluronidase streptococcique dérivées de la technique décrite par Faber. C'est celui que nous avons normalement utilisé dans nos travaux jusqu'alors, au pH de 6 et à la molarité de 0,1. Nous allons étudier, sur divers stades de la réaction et sur la réaction globale, l'influence de ce tampon, en fonction de la valeur de son pH et de la valeur de sa molarité. Tout d'abord, la molarité demeurant fixée à 0,1, nous ferons varier le pH, puis le pH étant choisi à des valeurs utilisables, nous ferons varier les molarités.

1. — Etude de la réaction en fonction du pH

a) PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

Tampons. — Nous commençons par préparer des tampons à 0.5 M à partir des solutions stocks d'acide acétique et d'acétate (formule page 26), aux pH suivants :

pH	Solution stock d'acide acétique (parties)	Solution stock d'acétate de Na (parties)
7,6	0	100
6,7	1	99
6,0	3	97
5,3	20	80
4,8	45	55
4,7	50	50
4,3	74	26

Au moment de l'emploi, nous préparons à partir de ces tampons des solutions tampons aux mêmes pH mais à molarité 0,1, ceci de la manière suivante :

— Solution précédente à molarité 0,5 : 20 ml.

— Solution de ClNa à 87,6 ‰ (soit 10 fois la teneur en ClNa du tampon I) . 10 ml.

— Eau distillée, q.s.p. : 100 ml.

Solutions d'acide hyaluronique. — L'acide hyaluronique est simplement dissous dans les tampons à molarité de 0,1, à raison de 50 mg pour 100 ml de tampon. On laisse la dissolution se terminer 24 heures à la glacière.

b) ETUDE DES TURBIDITÉS OBTENUES PAR PRÉCIPITATION D'ACIDE HYALURONIQUE PAR LE RÉACTIF SÉRIQUE.

Nous avons réparti les différentes solutions d'acide hyaluronique préparées comme ci-dessus dans des galeries de tubes de la manière suivante : 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,60, 0,70, 0,90, 1 ml.

A chacun de ces tubes nous avons ajouté du tampon correspondant en q.s.p. 1,5 ml puis 2 ml. de réactif sérique. Après quoi nous faisons la lecture des turbidités obtenues. Ces turbidités sont résumées dans le tableau de la fig. 10.

D'une façon générale nous pouvons dire que pour tous ces tampons les turbidités obtenues sont proportionnelles à la quantité d'acide hyaluronique et peuvent donc, en principe, permettre des lectures correctes : en effet la turbidité obtenue pour 0,50 ml est, dans la plupart des cas, voisine du double de celle obtenue pour 0,25 ml. (Il est intéressant de noter qu'à partir de 0,50 ml jusqu'à 1 ml les turbidités semblent se stabiliser à un certain chiffre, chiffre variant avec le pH du tampon).

REACTION : ACIDE HYALURONIQUE + RÉACTIF SÉRIQUE
VARIATIONS EN FONCTION DU pH DES TAMPONS ACÉTO-ACÉTIQUES
Tableau des Turbidités obtenues

TAMPONS AMOLARITÉ 0,1	QUANTITÉS DE SOLUTION D'ACIDE HYALURONIQUE EN ml														
pH	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
7,6	45	65	95	120	145	170	180	210	220	230	240	235	240	240	240
6,7	80	110	145	180	190	220	260	320	245	370	370	375	370	380	375
6,0	50	75	100	120	160	175	190	230	260	300	310	315	310	320	320
5,3	30	70	100	120	155	180	200	230	280	300	320	310	300	315	320
4,8	20	30	80	110	135	160	180	210	270	290	290	300	290	295	300
4,6	20	40	80	100	140	160	175	190	250	270	290	290	280	280	285
4,3	10	20	60	90	130	145	160	180	210	230	230	240	240	230	240

Fig. 10

Les turbidités sont exprimées en D.O. $\times$ 1.000

c) ETUDE DU TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA PNEUMOHYALURONIDASE.

C'est l'étude du comportement de la pneumohyaluronidase vis-à-vis de l'acide hyaluronique, en fonction des différents pH des tampons précédents.

Nous avons utilisé notre technique habituelle de titrage. Les résultats obtenus sont portés dans la fig. 11.

Nous remarquons une nette influence du pH sur l'activité enzymatique, en effet :

— de pH 7,6 à pH 5,3 : aucune variation du titre de la pneumohyaluronidase.

— à partir du pH 5,3 jusqu'à pH 4,3 : l'activité de l'enzyme diminue progressivement et finit par disparaître presque complètement.

d) ETUDE DU TITRE DU SÉRUM.

Nous avons d'abord étudié seulement le comportement du sérum étalon vis-à-vis de ces différents tampons. En effet dans cette gamme de pH très étendue il était utile de procéder à une étude préliminaire afin de déterminer les pH utilisables et de rejeter ceux où le titrage des sérums est impossible. (A la fin de cette étude préliminaire et après notre étude en fonction de la molarité nous titrerons quelques sérums sujets).

Nous avons utilisé la technique habituelle, mais en remplaçant le tampon I par chacun des tampons préparés précédemment.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau de la fig. 11.

ETUDE DES RÉACTIONS ENZYME - SUBSTRAT

**ET ENZYME - ANTIVENYME EN FONCTION
DU pH DU TAMPON ACÉTO - ACÉTIQUE**

pH DU TAMPON ACÉTO - ACÉTIQUE	7,6	6,7	6,0	5,3	4,8	4,6	4,3
TITRE DE LA PNEUMO- HYALURONIDASE (EN UNITÉS PAR 0,50ml DE SOLUTION A 2,5 %)	1,85	2	2	1,66	1,42	1,10	0,55
TAUX DU SÉRUM ÉTALON (EN UNITÉS PAR ml DE SÉRUM PUR)	950	1.010	1.050	890	740	370	

Fig. 11

Nous constatons que :

— de pH 7,6 à pH 5,3 les taux d'antienzyme sont presque identiques.

— A partir de pH 5,3 les taux commencent à diminuer pour atteindre la limite de possibilité de titrage à pH 4,6 - 4,3.

CONCLUSIONS.

Cette étude nous permet de dire que le pH a un rôle certain dans la bonne marche de la réaction ; mais son influence s'exerce surtout dans les stades Enzyme-Antienzyme et Enzyme-Substrat.

2. — Etude de la réaction en fonction de la molarité

Dans ce chapitre nous allons nous consacrer à l'étude du comportement de la réaction en fonction des variations de la molarité pour divers pH du tampon acéto-acétique. Précédemment nous avons étudié le comportement de la réaction vis-à-vis des différents pH. Nous avons en effet constaté que la bonne marche de la réaction dépend beaucoup du pH du milieu. Maintenant nous allons considérer les pH où la réaction s'est comportée correctement et dans chacun de ces pH nous allons faire varier la molarité.

Nous prendrons les pH suivants : 7,6, 6,0, 4,8 ;
et les molarités : 0,2, 0,1, 0,02 M.

Dans une première partie nous étudierons la turbidité de la réaction acide hyaluronique + réactif sérique dans ces divers tampons ; ensuite dans une 2^e partie nous étudierons l'ensemble de la réaction (hyaluronidase + acide hyaluronique ; acide hyaluronique + réactif sérique).

PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS.

Les différents tampons sont préparés à partir des solutions tampons utilisées précédemment.

Pour obtenir une molarité de 0,2 M. nous prenons :

- Tampon précédent (0,5 M.) 40 ml.
- Solution ClNa (à 87,6 %) : 20 ml.
- Eau : 40 ml.

Pour obtenir tampon à 0,1 M. :

— Tampon (0,5 M.) : 20 ml.

— Solution ClNa (à 87,6 ‰) : 10 ml.

— Eau : 70 ml.

Pour notre étude nous avons donc préparé 9 tampons :

		pH lu au pHmètre	n° d'ordre
pH : 7,6 Théorique	à 0,2 M.	7,45	1
	à 0,1 M.	7,5	2
	à 0,02 M.	7,5	3
pH : 6,0 Théorique	à 0,2 M.	5,9	4
	à 0,1 M.	6,1	5
	à 0,02 M.	6	6
pH : 4,8 Théorique	à 0,2 M.	4,75	7
	à 0,1 M.	4,70	8
	à 0,02 M.	4,70	9

a) Etude des variations de la turbidité en fonction de ces différents tampons

Nous allons, tout d'abord étudier la turbidité donnée par l'acide hyaluronique (en solution dans chacun de ces tampons) lorsqu'on y ajoute le réactif sérique.

Pour cela nous préparons des solutions d'acide hyaluronique (à 0,50 ‰ comme précédemment) dans chacun de ces 9 tampons. Pour chacun de ces 9 tampons nous préparons une galerie de la manière suivante :

15 tubes par galerie.

Acide Hyaluronique dans un tampon donné : 0,05 0,10 0,15 0,20 0,25 0,30 0,35 0,40 0,45 0,50 0,60 0,70 0,80 0,90 1 ml.

Tampon correspondant q. s. p. : 1,5 ml.

Une fois cette galerie préparée on ajoute dans chaque tube la quantité habituelle de réactif sérique. Après le temps de repos habituel, ces tubes sont passés au photomètre.

RÉACTION: ACIDE HYALURONIQUE + RÉACTIF SÉRIQUE
VARIATIONS EN FONCTION DE LA MOLARITÉ DES DIFFÉRENTS TAMPONS

TAMPONS		QUANTITÉ DE SOLUTION D'ACIDE HYALURONIQUE												CHIFFRES LUS AU LUMÉTRON INDICANT LA TURBIDITÉ				
pH	Molarité	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00		
		0	30	35	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
7,6	0,2	45	65	95	120	145	170	180	210	220	230	240	235	240	240	240		
	0,1	20	20	30	40	75	115	125	160	190	220	260	300	340	350	350		
6,3	0,2	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	30	30	30		
	0,1	50	75	100	120	160	175	190	200	220	230	240	250	250	250	245		
	0,02	20	20	30	50	90	125	145	175	210	240	270	320	360	370	390		
	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	25		
4,8	0,1	20	30	80	115	140	170	195	210	240	270	260	270	280	280	280		
	0,02	0	0	0	20	60	105	125	165	185	210	260	300	320	330	360		

Fig. 12
 Les turbidités sont exprimées en D.O. $\times$ 1.000

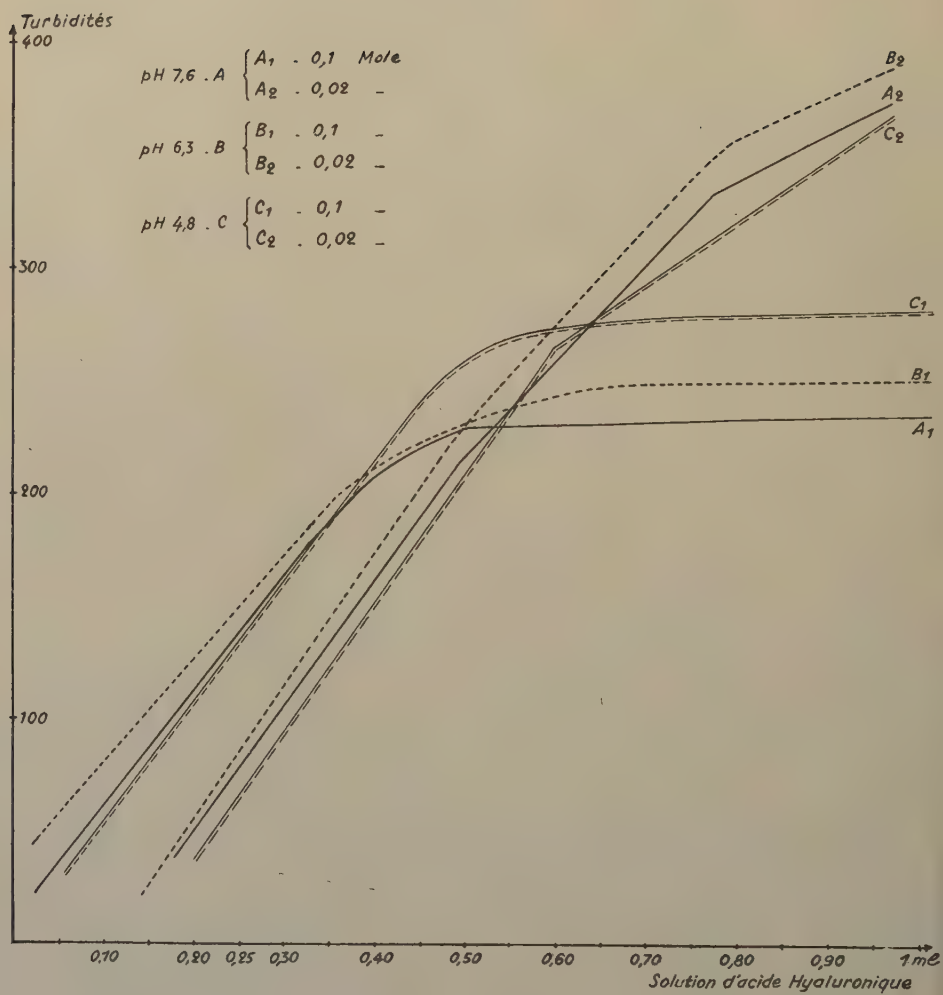


Fig. 13

Les résultats de toutes ces mesures sont portés d'une part sur le tableau n° 12 et d'autre part sur des graphiques avec, en abscisses, les quantités d'acide hyaluronique et, en ordonnées, les turbidités correspondantes lues au photomètre exprimées en D.O. $\times$ 1.000 (fig. 13).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

1^{er} tampon (pH 7,6, molarité 0,2 M.).

Résultats ininterprétables : en effet cette forte molarité semble inhiber la formation du complexe acide hyaluronique + protéines sériques : la précipitation est en quantité insuffisante pour être interprétée et constante dans tous les tubes.

4^e tampon (pH 6,0, molarité 0,2 M.).

Résultats ininterprétables.

7^e tampon (pH 4,8, molarité 0,2 M.).

Résultats ininterprétables.

Conclusion.

Pour ces 3 tampons les résultats sont identiques, c'est-à-dire non interprétables, mais nous pouvons remarquer que la formation du précipité (en quantité minime) se fait à différents niveaux dans la galerie, suivant le pH considéré : en effet le précipité se forme :

- A partir du 2^e tube (0,10 de solution d'acide hyaluronique) pour pH 7,6.
- A partir du 7^e tube (0,35 de solution d'acide hyaluronique) pour pH 6,0.
- à partir du 10^e tube (0,50 de solution d'acide hyaluronique) pour pH 4,8.

Ainsi nous pouvons dire qu'à molarité égale plus le pH est acide, plus la formation du précipité est difficile et exige une quantité plus importante d'acide hyaluronique, et que le précipité, formé à cette molarité si forte, est le même quelle que soit la quantité d'acide hyaluronique présente.

Tampon n° 2 (pH 7,6, molarité 0,1 M.). La courbe représentative nous indique un palier à partir du 10^e tube (contenant 0,50 ml de solution acide hyaluronique) et déjà une inflexion à partir du 8^e tube

(0,40 ml de solution d'acide hyaluronique). La partie rectiligne, où la turbidité est directement proportionnelle à la quantité d'acide hyaluronique présente, s'étend du 1^{er} tube au 8^e tube.

Tampon n° 5 (pH 6,0, molarité 0,1 M.) : la courbe représentative à la même allure que ci-dessus mais le palier est à une ordonnée plus grande.

Tampon n° 8 (pH 4,8 molarité 0,1 M.) : la courbe représentative à la même allure mais le palier est à une ordonnée encore plus élevée.

Conclusions.

Ici nous avons constaté à peu près le même phénomène que précédemment, c'est-à-dire que pour une même molarité le pH a une influence sur la réaction : en effet la turbidité maximum augmente avec l'acidité du tampon.

Tampon n° 3 (pH 7,6, molarité 0,02) : la courbe représentative est presque rectiligne et on peut la considérer comme franchement rectiligne de 0,05 à 0,80.

Tampon n° 6 : (pH 6,0, molarité 0,02) : idem.

Tampon n° 9 (pH 4,8 molarité 0,02) : idem.

En conclusion nous pouvons dire que la molarité joue un rôle très important dans la réaction de précipitation de l'acide hyaluronique par le réactif sérique. Théoriquement il vaudrait mieux utiliser un tampon avec une faible molarité.

Nous allons maintenant étudier le comportement de la réaction de titrage de la hyaluronidase pneumococcique dans tout son ensemble vis-à-vis de ces différents tampons.

**b) Etude du comportement de la réaction (dans son ensemble)
en fonction de la molarité des divers tampons**

Dans cette partie nous allons compléter l'étude précédente : en effet nous venons de constater que la molarité a un rôle extrêmement important dans la réaction de précipitation de l'acide hyaluronique par le réactif sérique ; maintenant nous allons considérer le rôle de cette molarité sur l'ensemble de la réaction : c'est-à-dire que nous allons faire des titrages du pouvoir antihyaluronidasique des sérums, titrages effectués en utilisant les divers tampons indiqués au début de ce chapitre. Mais nous n'allons pas utiliser tous les 9 tampons : en effet notre précédente étude nous a montré qu'il est quasi impossible d'obtenir un précipité du complexe acide hyaluronique + protéines sériques, quand la molarité des tampons est trop forte, ainsi nous éliminons d'office les tampons à molarité de 0,2 M., il nous reste donc 6 tampons.

Pour ces titrages nous utilisons la technique habituelle et nous exprimons les résultats :

— D'abord en unités, calculées par rapport au titre de la hyaluronidase pneumococcique employée.

— Puis, en multiples du taux du sérum étalon.

Ces résultats obtenus sont groupés dans le tableau fig. 14.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

— Une première constatation s'impose : pour les tampons à faible molarité le titrage des sérums donne des résultats incalculables.

— Pour les tampons à 0,1 M. nous pouvons constater que le pH joue un rôle important : en effet les résultats exprimés en unités (calculées par rapport au titre de la hyaluronidase pneumococcique utilisée) sont discordants pour les différents pH, par contre ceux qui sont exprimés par rapport au sérum étalon sont presque identiques (même on pourrait dire qu'ils sont identiques si on tenait compte de l'erreur 20 à 30 % admise dans cette méthode de titrage) pour les différents pH.

CONCLUSIONS :

De cette étude du comportement de la réaction de titrage du pouvoir inhibiteur de l'anti-hyaluronidase pneumococcique des sérums en

INFLUENCE DE LA MOLARITÉ DES TAMPONS A DIVERS pH

SUR LA RÉACTION DE TITRAGE DES SÉRUMS

TAMPON		TITRE DE LA HYALURONI- DASE PNEUMO- COCCIQUE EN UNITÉS PAR 0,50 ml	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS-SUJETS EXPRIMÉS EN UNITÉS PAR ml			PAR RAPPORT AU SÉRUM-ÉTALON	
pH	MOLARITÉ			y	z	y	z	
7,6	0,1	1,66	441	5571	1560	12,5	3,5	
	0,02	INCALCULABLE		INCALCULABLE		INCALCULABLE		
6,3	0,1	3	1136	15363	4387	13,8	3,9	
	0,02	INCALCULABLE		INCALCULABLE		INCALCULABLE		
4,8	0,1	2,08	658	7461	2050	11,3	3,1	
	0,02	INCALCULABLE		INCALCULABLE		INCALCULABLE		

Fig. 14

fonction de la molarité des tampons à divers pH nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

— La molarité des tampons joue un rôle très important et même on peut dire que c'est elle qui conditionne la bonne marche de la réaction.

En effet une molarité trop forte ($\geq 0,2$ M.) empêche la formation du précipité d'acide hyaluronique par addition du réactif sérique et de ce fait empêche la lecture des résultats du titrage. De plus une molarité trop faible ($\leq 0,02$ M.) donne au titrage des sérums des résultats incalculables.

— Le pH, lui-même, joue aussi un rôle certain : pour la même molarité nous avons constaté la différence des taux en unité pour le même sérum.

Mais si nous exprimions les résultats des sérums sujets par rapport au sérum étalon, le rôle joué par le pH disparaîtrait ou tout au moins serait très réduit.

II. — Tampon phosphatés de Soerensen

Nous nous consacrons ici à l'étude de l'influence des tampons phosphatés de Soerensen à divers pH et à diverses molarités sur la réaction. Ce tampon est souvent utilisé. Il était donc intéressant de vérifier s'il donnait des résultats plus intéressants que les tampons acéto-acétiques.

Comme précédemment nous allons commencer par l'étude de la précipitation de l'acide hyaluronique par le réactif sérique, puis l'activité de la pneumohyaluronidase, puis enfin la réaction de titrage des sérums.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS.

Nous commençons par préparer 2 solutions :

<i>Solution A</i> à 1/5 M : KH_2PO_4	27,234 g
Eau distillée	q.s.p 1.000 ml
<i>Solution B</i> à 1/5 M : Na_2HPO_4 , 12 H_2O	71,685 g
Eau distillée	q.s.p 1.000 ml

A partir de ces solutions A et B, nous préparons les solutions tampons suivantes :

— Tampon O	— Solution A	15,5	pH = 5,4
	— Solution B	q.s.p. 500	1/5 M
— Tampon P	— Tampon O	83,3	pH = 5,4
	— Eau distillée ..	q.s.p. 250 ml	1/15 M
— Tampon Q	— Tampon O	27,7	pH = 5,4
	— Eau distillée ..	q.s.p. 250 ml	1/45 M
— Tampon R	— Solution A	19,5	pH = 7
	— Solution B	q.s.p. 500	1/5 M
— Tampon S	— Tampon R	83,3	pH = 7
	— Eau distillée ..	q.s.p. 250 ml	1/15 M
— Tampon T	— Tampon R	27,7	pH = 7
	— Solution B ..	q.s.p. 250	1/45 M
— Tampon U	— Solution A	27,5	pH = 8
	— Solution B	q.s.p. 500	1/5 M
— Tampon V	— Tampon U	83,3	pH = 8
	— Eau distillée ..	q.s.p. 250 ml	1/15 M
— Tampon W	— Tampon U	27,7	pH = 8
	— Eau distillée ..	q.s.p. 250 ml	1/45 M

Les pH ainsi obtenus représentent la gamme des pH possibles du tampon phosphaté de Sørensen.

ÉTUDE DES TURBIDITÉS OBTENUES AVEC L'ACIDE HYALURONIQUE EN SOLUTION DANS CES DIFFÉRENTS TAMPONS.

Dans chacun de ces tampons nous dissolvons la quantité habituelle d'acide hyaluronique (50 mg pour 100 ml de tampon). La dissolution est parfaite après un séjour de 24 heures à la glacière.

Les résultats obtenus à l'aide du photomètre sont résumés dans la fig. 15 (les chiffres y figurant sont des turbidités données par le photomètre Lumetron exprimées en D.O. $\times$ 1.000), et le graphique 15^{bis}.

D'un coup d'œil, sur l'ensemble des résultats obtenus nous pouvons dire que la molarité joue encore ici un rôle important : en effet, nous

**ÉTUDE DES TURBIDITÉS EN FONCTION DES TAMPONS
PHOSPHATÉS DE SOENRENSSEN**

TAMPONS		QUANTITÉ DE SOLUTION D'ACIDE HYALURONIQUE en ml											
pH	MOLARITÉ	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,75	
5,4	1/5	40	50	90	110	135	160	190	210	225	240	300	
	1/15	0	0	20	40	100	120	135	155	175	200	270	
	1/45	0	0	0	0	0	40	60	105	135	150	280	
7	1/5	20	40	40	40	70	80	80	80	80	95	100	
	1/15	0	0	60	120	125	145	170	200	210	245	330	
	1/45	10	10	10	20	30	40	85	115	140	180	290	
8	1/5	20	20	20	20	20	20	20	25	20	30	20	
	1/15	20	30	60	100	125	165	190	210	260	255	310	
	1/45	10	10	10	10	20	60	110	135	160	175	320	

Fig. 15
Les résultats sont exprimés en D.O. $\times 1.000$

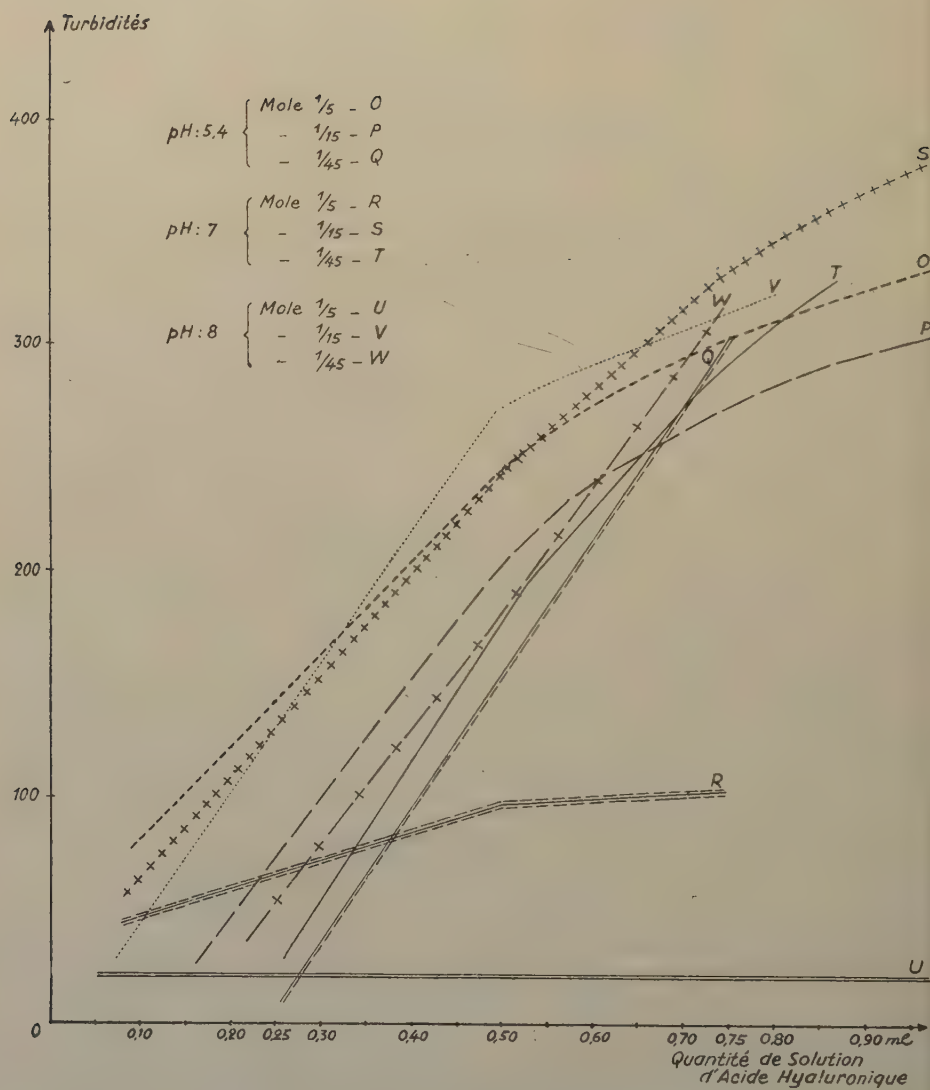


Fig. 15^{bis}
Les turbidités sont exprimées en D.O. $\times$ 1.000

constatons que pour les trois pH (5,4 , 7 et 8), les tampons à molarité moyenne (c'est-à-dire à 1/15 M) permettent une bonne marche de la réaction, puisque, pour ces tampons, la turbidité obtenue pour 0,25 ml de solution d'acide hyaluronique est la moitié de celle obtenue pour 0,50 ml de la même solution. Donc nous avons là une correspondance parfaite entre les quantités d'acide hyaluronique et les turbidités données par elle avec le réactif sérique.

Pour les tampons à molarité assez forte (1/5 M), nous constatons que seul le tampon à pH 5,4 est utilisable : en effet, nous avons obtenu dans ce tampon, pour 0,25 ml de solution d'acide hyaluronique, une turbidité de 135 et pour 0,50 ml de la même solution d'acide hyaluronique, une turbidité de 240 qui est presque le double. Quant aux deux autres tampons à molarité 1/5, les résultats obtenus ne permettent pas leur utilisation.

Des tampons à faible molarité (1/45 M), aucun n'est utilisable.

Nous voyons donc que la molarité des tampons joue un rôle primordial, mais nous ne pouvons nier, ni négliger le rôle du pH : en effet, à molarité égale, le pH joue un rôle indiscutable. Ainsi pour la molarité 1/5 à pH 5,4, il existe encore une correspondance entre la quantité d'acide hyaluronique et la turbidité obtenue ; mais aux deux autres pH, les tampons correspondant à la même molarité, les turbidités obtenues sont très faibles : pour pH 7, les turbidités obtenues augmentent avec la quantité d'acide hyaluronique, mais cette augmentation n'est pas proportionnelle avec cette dernière. D'autre part, pour pH 8 nous n'obtenons qu'une très faible précipitation de l'acide hyaluronique par le réactif sérique ; de plus, cette précipitation est de la même intensité quelle que soit la quantité d'acide hyaluronique.

De cette étude nous pouvons tirer une fois encore la conclusion suivante : la précipitation de l'acide hyaluronique par le réactif sérique dépend principalement de la molarité et secondairement du pH.

ETUDE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.

Pour cette étude nous pouvons éliminer d'emblée les tampons non utilisables, c'est-à-dire ceux qui, précédemment, n'ont pas donné des turbidités correctes, en l'occurrence les suivants : pH 5,4 à 1/45 M, pH 7 à 1/5 et à 1/45 M, pH 8 à 1/5 et à 1/45 M.

Mais en pratique nous n'avons éliminé que les tampons à pH 7 à 1/5 M et à pH 8 à 1/5 M, tampons où les turbidités sont presque uni-

**ETUDE DE LA RÉACTION EN FONCTION
DES DIVERS TAMPONS PHOSPHATES DE SOERENSEN**

TAMPONS		TITRE DE LA HYALURONIDASE (en unités par 0,50 ml de solu- tion à 2,5%)	TAUX DU SÉRUM ÉTALON	TAUX DES SÉRUMS - SUJETS			
				PAR RAPPORT À L'ACIDE HYALURONIQUE (Technique A. H.)		PAR RAPPORT AU SÉRUM ÉTALON (Technique S. E.)	
pH	MOLARITÉ			Y	Z	Y	Z
5,4	$\frac{1}{5}$	2,95	1160	9,750	2,000	9,5	2
	$\frac{1}{15}$	2,77	1.085	11,645	2,450	11	2,5
	$\frac{1}{45}$	Activité enzymatique trop faible : TITRAGE IMPOSSIBLE					
7	$\frac{1}{15}$	3,1	1.166	12,209	2,625	11,5	2,7
	$\frac{1}{45}$	Activité enzymatique trop faible : TITRAGE IMPOSSIBLE					
8	$\frac{1}{15}$	2,86	990	10,568	2,006	10,5	2
	$\frac{1}{45}$	Activité enzymatique trop faible : TITRAGE IMPOSSIBLE					

Fig. 16

formes pour toutes les quantités d'acide hyaluronique. En effet, nous tenons à connaître l'activité de la pneumohyaluronidase dans le plus grand nombre de tampons possible.

Le titrage de l'activité enzymatique se fait dans les conditions habituelles. Les résultats obtenus sont portés dans la figure 16 (2^e colonne).

Tout d'abord nous constatons que pour les tampons à pH 5 à 1/45 M, à pH 7 à 1/45 M et à pH 8 à 1/45 M, l'activité enzymatique est trop faible pour permettre un dosage d'anticorps.

Pour les autres tampons, les titres obtenus pour la pneumohyaluronidase sont un peu plus élevés que le titre habituel. Ces titres sont très proches entre eux.

Ici encore nous constatons que la molarité prédomine sur le pH.

Cette étude nous permet d'éliminer les tampons inutilisables et de réserver notre étude du comportement de la réaction, sur les tampons phosphatés de Sørensen suivants : pH 5,4 à 1/5 et à 1/15 M, pH 7 à 1/15 M et pH 8 à 1/15 M.

ETUDE DE LA RÉACTION DE TITRAGE DES SÉRUMS.

Pour cette étude nous n'avons utilisé que deux sérums (les sérums Y et Z), l'un fort, l'autre faible.

Les titrages de ces sérums se font dans les conditions habituelles.

Les résultats obtenus sont portés dans la figure 16. Ces résultats sont exprimés d'une part par rapport à l'acide hyaluronique, c'est-à-dire en unités par ml de sérum pur, et d'autre part, par rapport au sérum étalon.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont presque identiques pour les différents tampons.

CONCLUSION.

L'étude de la réaction en fonction des divers tampons phosphatés de Sørensen nous permet de constater que :

— comme pour les tampons acéto-acétiques, le pH a un rôle certain dans la bonne marche de la réaction ;

— la molarité joue un rôle encore plus important : en effet, alors que les variations du pH n'entraînent que de légères modifications de la marche de la réaction, la molarité, elle, arrive parfois à supprimer totalement un stade de la réaction.

B. — INFLUENCE DES SELS DU BOUILLON DE CULTURE, RENFERMANT LA PNEUMOHYALURONIDASE, SUR LA REACTION

Sur le millilitre de mélange réactionnel où se fait la neutralisation antigène-anticorps, puis sur le 1,5 ml du mélange où s'effectue l'attaque du substrat par l'enzyme non neutralisée, 0,50 ml représente le réactif « Hyaluronidase », lui-même préparé par dilution du bouillon de culture des pneumocoques dans du tampon. Selon que les germes produisent une plus ou moins grande quantité de hyaluronidase dans le bouillon, on est obligé de diluer plus ou moins ce dernier. Si la dilution est forte, l'apport des sels du bouillon de culture n'aura que très peu d'influence. C'est ce qui, a priori, doit se passer dans la hyaluronidase que nous avons utilisée dans ce travail : le bouillon étant dilué à 2,5 % dans du tampon, la dilution finale de celui-là sera de 1,25 % dans la réaction de neutralisation, et de 0,8 % dans la réaction enzymatique. Mais on pourra être amené à utiliser des hyaluronidases d'activité beaucoup plus faible et il sera alors possible d'envisager la nécessité d'une dialyse pour priver le bouillon des sels qui, comme nous venons de voir, peuvent jouer un rôle inhibiteur.

Nous avons donc préparé des solutions de pneumohyaluronidase à 2,5 %, non pas dans du tampon pur, mais dans du tampon renfermant successivement 10 %, 25 %, 50 % de bouillon de culture (Bouillon spécial pour la culture des pneumocoques de l'Institut Pasteur), et même finalement dans du bouillon pur sans tampon.

Le tableau suivant nous montre que la solution de hyaluronidase à 2,5 % titre 2,5 unités par 0,50 ml lorsque la dilution est effectuée dans du tampon, mais qu'elle ne titre plus que 2,2 unités lorsque le tampon renferme 10 % de bouillon spécial, 1,5 unités lorsqu'il contient 25 % de ce bouillon. Lorsque la proportion de bouillon spécial augmente encore dans le diluant, l'activité enzymatique devient trop faible pour être mesurée.

COMPOSITION DU DILUANT	TITRE DE LA PNEUMOHYALURONIDASE A 2,5 %
Tampon I	2,5 unités/0,50 ml
Tampon I + 10 % de bouillon spécial ..	2,2 unités/0,50 ml
Tampon I + 25 % de bouillon spécial ..	1,5 unités/0,50 ml
Tampon I + 50 % de bouillon spécial ..	L'activité enzymatique est trop faible pour être calculée.
Bouillon spécial 100 %	L'activité enzymatique est nulle.

Nous avons également comparé l'activité de deux solutions de pneumohyaluronidase dans du tampon I, l'une des solutions étant constituée par le simple bouillon de culture centrifugé (comme celui que nous utilisons d'habitude), l'autre étant ce même bouillon, mais dialysé contre eau courante, puis contre eau distillée et enfin contre le tampon I. La dilution de la première solution était notre dilution habituelle à 2,5 %, l'autre était la dilution correspondante, en tenant compte des variations de volume du bouillon au cours de la dialyse. Les résultats obtenus furent identiques pour ces deux solutions de hyaluronidase : donc, à la dilution de 2,5 %, il est inutile d'utiliser un réactif enzymatique dialysé. Au contraire, dans le cas de solution d'enzyme d'activité trop faible, on pourra être amené à dialyser ce réactif pour le rendre utilisable.

CHAPITRE VI

ESSAI DE CONSERVATION DES REACTIFS

Dans ce chapitre, nous étudierons exclusivement la conservation de la pneumohyaluronidase et des sérums. Les autres réactifs (tampons, réactif sérique, solution d'acide hyaluronique) ne sont pas particuliers au dosage des anti-enzymes pneumococciques et leur bonne conservation a été établie dans d'autres travaux. L'enzyme est a priori susceptible d'être fragile comme le sont la plupart des enzymes de cette espèce, même lorsqu'elles ne sont pas purifiées comme celle que nous employons. On pourra toujours remédier à un affaiblissement de l'activité enzymatique en diluant moins ce réactif, quitte, s'il le faut, à le dialyser. Mais la nécessité de vérifier souvent son titre entraîne des dosages fastidieux et fort gênants pour des analyses entreprises en grandes séries. Quant aux sérums, l'intérêt de leur conservation est évident, surtout lorsqu'on opère avec un sérum étalon comme nous le faisons dans notre méthode S.E.

Mode opératoire

Nous avons conservé la pneumohyaluronidase et le sérum étalon à des dilutions diverses et à des températures différentes.

Les températures furent les suivantes :

- Température du laboratoire (environ + 18°).
- A la glacière : + 4°.
- A la glacière : — 18°.

Les dilutions utilisées furent :

- a) pour la pneumohyaluronidase : — pure série A
— 20 % série B
— 2,5 % série C

ESSAI DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

DURÉE DE CONSERVATION	TEMPÉRATURE	PNEUMO - HYALURONIDASE en unités / 0,5 ml de SOL. 2,5 %			SÉRUM - ÉTALON en unités / ml de sérum pur		
		A PURE	B 20 %	C 2,5 %	I PUR	II 1/10	III 1/250
24 HEURES	T° du Laboratoire	2,3	2,2	1,9	1180	1100	1200
	+ 4°	2,2	2	2,1	1200	1160	1220
48 HEURES	T° du Laboratoire	2,1	1,9	2,1	1007	1020	1200
	+ 4°	2	2,1	2	1150	1010	1120
4 JOURS	T° du Laboratoire	1,9	2	1,9	1110	1150	1100
	+ 4°	2	2	2,1	1258	1100	1170
8 JOURS	T° du Laboratoire	1,9	1,8	1,8	1015	1090	995
	+ 4°	2,2	1,9	2	1190	1050	1265
15 JOURS	T° du Laboratoire	1,6	1,8	1,3	990	1010	950
	+ 4°	2,3	2	2,1	1200	1175	1090
1 MOIS	T° du Laboratoire	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE TROP FAIBLE : TITRAGE IMPOSSIBLE			507	650	810
	+ 4°	2	1,9	2,3	1070	990	1165
	- 18°	2,1	2,4	2	1210	1150	1200
2 MOIS	T° du Laboratoire				SÉRUMS ALTÉRÉS		
	+ 4°	1,2	1,4	1,5	950	1070	890
	- 18°	2	2,5	2,2	1295	1200	1097
3 MOIS	T° du Laboratoire						
	+ 4°	1,3	1	1,1	770	690	810
	- 18°	2,4	2,1	2	1090	1230	1185

Fig. 17

- b) pour le sérum étalon : — pur série I
— 1/10 série II
— 1/250 série III

Ces dilutions furent faites dans notre tampon I stérilisé. Ainsi obtenues, ces diverses séries furent réparties stérilement en petite quantité dans plusieurs tubes à hémolyse stériles. Ces derniers furent recouverts de capsule en caoutchouc pour éviter l'évaporation qui aurait pu entraîner une concentration des réactifs. Cette répartition en petite quantité nous permit de prélever, pour nos titrages, les réactifs sans risques d'altération des quantités restantes. Nous répartîmes les réactifs en autant de tubes à hémolyse que de titrages nécessaires pour notre travail.

Interprétation des résultats

Nous avons pratiqué les titrages après : 24 heures, 48 heures, 4 jours, 8 jours, 15 jours, 30 jours, 60 jours, 90 jours de conservation.

De 24 heures à 15 jours, nous avons titré seulement les séries conservées à la température du laboratoire et à $+4^{\circ}$, estimant fort improbable des modifications survenant durant ces courtes périodes à -18° .

Pour le titrage des séries de sérum étalon, nous nous servîmes non pas de la pneumohyaluronidase conservée à la même température, mais de l'enzyme habituelle conservée à -18° .

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 17.

L'enzyme utilisée sous forme de dilution à 2,5 % titrait à l'origine de 2 à 2,5 unités. L'étude des résultats de titrages ultérieurs permet de constater que :

— la conservation à -18° (l'enzyme étant congelée) garde intact le titre de la pneumohyaluronidase ainsi que celui du sérum étalon, quelles que soient les dilutions de ces deux éléments ;

— à la température du laboratoire, une conservation de longue durée est impossible quelles que soient les précautions prises : en effet, jusqu'à 4 jours nous n'avons pas noté de changement, mais à partir du 8^e jour, nous constatons une baisse de l'activité enzymatique. Cette baisse est telle qu'à un mois nous ne pouvons plus titrer la pneumohyaluronidase. En ce qui concerne le sérum étalon :

à un mois nous constatons une importante diminution du taux d'anti-enzyme et une différence entre les dilutions : le taux du sérum étalon conservé à l'état pur baisse beaucoup plus rapidement que celui du sérum étalon conservé à la dilution de $1/250$. Ainsi il apparaît que la présence du tampon I semble avoir un effet conservateur de l'anti-enzyme. Mais à partir de deux mois, il ne nous est plus possible de titrer ni la pneumohyaluronidase, ni le sérum étalon ;

— à la température de $+ 4^{\circ}$, la conservation a été bonne jusqu'à un mois, mais au 2° mois nous voyons déjà amorcer une baisse de l'activité de la pneumohyaluronidase ; au 3° mois une baisse du sérum étalon : ici encore il est à remarquer que le sérum étalon conservé à la dilution de $1/250$ garde un taux d'anti-enzyme plus élevé que celui conservé aux dilutions plus faibles.

De cette expérience il faut retenir que la hyaluronidase pneumococcique et le sérum étalon se conservent fort correctement durant plusieurs mois lorsqu'ils sont congelés. C'est donc de cette façon qu'il convient de conserver les réactifs de base. Aux dilutions d'emploi ces réactifs se conservent aussi bien à l'état congelé, mais il est plus commode de les garder simplement à la glacière à $+ 4^{\circ}$. Dans ces conditions, une conservation de plusieurs jours, voire même de quelques semaines, est possible. Et si l'on oublie à la température du laboratoire ces réactifs durant une ou deux nuits, ils n'en seront pas de ce fait obligatoirement altérés.

En résumé, la conservation des réactifs ne pose pas de problème pour un laboratoire d'équipement normal.

TITRAGE DES SÉRUMS
(Technique S.E.)

DOSAGES N° →	I	II	III	IV	V	MOYENNE
s. sujet N°1	0,5	0,51	0,5	0,4	0,47	0,47
—— N°2	2	2,1	2,1	2,8	3	2,4
—— N°3	3,1	3	4,1	3,4	3,6	3,44
—— N°4	6	7,1	6,8	7,2	6,3	6,68
—— N°5	1	1,1	1,4	1,6	1	1,2
—— N°6	1,8	2,2	2,2	2	2,4	2,12
—— N°7	9,6	10,9	10,4	9,8	9,2	9,8
—— N°8	2,8	2,5	2,9	3,2	3,1	2,9
—— N°9	10,9	11	11,5	11,7	11	11,22
—— N°10	15,8	15,5	16	17,2	15,2	15,90

Fig. 18

TITRAGE DES SÉRUMS (TECHNIQUE A. H.)

les titres des Sérums sont exprimés en unités/ml de Sérum pur

DOSAGES N° →	I	II	III	IV	V	MOYENNE ↓	ÉCART DES EXTRÊMES
SÉRUM ÉTALON	1040	1230	1125	1440	1200		
S. SUJET N°1	510	625	570	605	575	599	115 unités
—— 2	2.100	2.500	2.390	4.030	3.615	2.947	1.930 —
—— 3	3.220	3.700	4.615	4.900	4.310	4.149	1.680 —
—— 4	6.246	8.733	7.660	10.296	6.580	7.903	3.950 —
—— 5	1.000	1.315	1.580	2.314	1.166	1.475	1.314 —
—— 6	1.873	2.700	2.520	2.835	2.880	2.561	1.007 —
—— 7	9.980	12.411	11.700	14.178	11.040	11.862	4.198 —
—— 8	2.962	3.080	3.260	4.610	3.734	3.609	1.648 —
—— 9	11.340	13.541	12.935	16.850	13.280	13.589	5.510 —
—— 10	16.446	19.060	18.050	24.768	18.243	19.513	8.322 —

Fig. 19

CHAPITRE VII

CONSTANCE DES RESULTATS DANS LA TECHNIQUE UTILISANT UN SERUM ETALON

Sur des sérums sujets choisis au hasard dans notre collection de sérums, nous avons pratiqué des titrages d'antihyaluronidase pneumococcique, en utilisant successivement la technique A.H. et la technique S.E.

Les résultats obtenus sont groupés dans les figures 18 et 19.

Les constatations que nous pouvons tirer de ces résultats sont les suivantes :

— En utilisant la technique A.H., nous trouvons 38 % des dosages correspondant à une erreur $\leq \pm 10$ %, 72 % des dosages correspondant à une erreur $\leq \pm 20$ %.

D'autre part, il est à remarquer que pour les sérums à taux d'anti-enzyme élevés, il y a un très grand écart entre les différents titrages pour le même sérum : par exemple pour les sérums N° 4, 7, 9 et 10, les écarts entre les extrêmes des taux obtenus sont respectivement de 3.950, 4.198, 5.510 et 8.322 unités. Cette énorme différence en valeur absolue entre deux dosages du même sérum rend très difficile l'interprétation des résultats.

— En utilisant la technique S.E., nous trouvons 62 % des titrages correspondant à une erreur $\leq \pm 10$ % et 92 % correspondant à une erreur $\leq \pm 20$ %.

Ainsi nous voyons que les résultats obtenus d'après la technique S.E. sont beaucoup plus fidèles que ceux qui sont obtenus d'après la technique A.H.

CHAPITRE VIII

DISCUSSIONS SUR LE CHOIX D'UNE METHODE DE DOSAGE

Les expériences décrites dans les chapitres précédents nous permettent de répondre aux questions principales que nous nous posions au début de ce travail :

1. — Les dosages d'antihyaluronidase pneumococcique exigent-ils des facteurs techniques particuliers, ou peut-on accepter ceux généralement admis pour la détermination d'antihyaluronidase streptococcique ?

2. — Convient-il de prendre, comme élément de référence du système ANTIENZYME-ENZYME-SUBSTRAT, l'acide hyaluronique, et de suivre dans ce cas une technique dérivant de celle de V. Faber pour le titrage d'antistreptohyaluronidase, ou un sérum, qu'il s'agisse d'un sérum international (encore à créer) comme pour le dosage d'antistreptolysine, ou d'un sérum témoin prélevé chez des sujets apparemment sains, comme pour le dosage d'antistreptokinase, selon la technique de A. Bertoye, M. Carraz, P. Detolle ?

La réponse à la première question est claire : aucun impératif ne nous oblige à modifier les conditions opératoires utilisées à l'Institut Pasteur de Lyon pour le dosage d'antistreptohyaluronidase : neutralisation de l'antigène par l'anticorps durant 24 heures à la température du laboratoire, action de l'enzyme non neutralisée sur le substrat durant 30 minutes à 37° ; emploi de tampon acéto-acétique de pH 6 et de molarité 0,1 au cours de ces deux opérations ; utilisation du même réactif sérique pour révéler l'acide hyaluronique non dépolymérisé ; l'acide hyaluronique peut être utilisé aux mêmes taux de dilution que dans le cas d'antistreptohyaluronidase.

Nous sommes ainsi d'accord avec notre principe de travail : simplifier au maximum, en unifiant le plus possible les méthodes, notre système d'analyse des antienzymes bactériennes.

Quant au choix de l'élément de référence, il doit, à notre avis, se porter sur le sérum étalon plutôt que sur le substrat. Certes, en l'absence d'un sérum international de référence, chaque laboratoire devra utiliser comme sérum étalon les sérums des sujets sains, supposés non atteints de pneumococcie. L'emploi de tels sérums témoins est d'ailleurs utilisé avec succès, en laboratoire clinique, pour différents dosages, notamment pour la détermination du taux de prothrombine ; il en est de même pour le dosage d'antistreptokinase tel que nous le pratiquons à l'Institut Pasteur de Lyon.

Il est possible d'écarter les variations habituelles en choisissant comme sérum étalon le mélange d'un assez grand nombre de sérums supposés normaux, et la constitution d'une réserve de ce sérum est justifiable en raison de la bonne conservation du pouvoir inhibiteur dans les sérums congelés.

Par ailleurs, la pratique de ces dosages en séries importantes et fréquentes, avec l'utilisation de réactifs ayant été éprouvés dans les séries précédentes, permet de déceler aisément une anomalie due à la défaillance du sérum étalon. Or, tant que ces dosages ne seront pas très répandus, ils seront probablement pratiqués par un nombre assez restreint de laboratoires spécialisés opérant donc dans ces conditions favorables.

L'utilisation d'un sérum normal de référence permet, à notre avis, une comparaison entre les résultats de divers laboratoires. Certes, les taux normaux d'antihyaluronidase pneumococcique sont susceptibles de varier d'une région à l'autre, d'une époque à une autre, mais ces variations, pour gênantes qu'elles soient, n'entraînent sans doute pas de différences aussi importantes que l'emploi de substrats de référence variant d'un laboratoire à un autre, ou que l'utilisation de techniques mettant en œuvre des temps de neutralisation, des durées d'action enzymatique, et des conditions de température, de pH, de molarité, variables. Dans les pages précédentes nous avons vu, en effet, que quand on procède avec un sérum étalon, les sérums sujets, quelles que soient les variations du mode opératoire (sous réserve toutefois de l'avidité de l'anticorps), présentent des taux en rapport assez constant, pour chacun d'eux, avec le taux du sérum étalon. Au cours de ces expériences, nous

TABLEAU RÉCAPITULANT TOUS LES DOSAGES
AYANT ÉTÉ FAITS SUR LES SÉRUMS W, X, Y ET Z

SÉRUMS	TAUX D'ANTI PNEUMOHYALURONIDASE (Méthode S. E.)																				MOYENNE									
	9	7,5	7,5	7	6	7	8	9	7,5	6,9	9	7,5	8	9	9,1	8,5	11	8	8	8,3										
W																					7,8									
X	3	2,5	2,5	2	2	2	2,8	3	2,5	2	2,5	3	2,5	4	3	2,9	4,2	3	3,4	3		2,81								
Y	14	14	13	12	10	9,5	11	11,5	10	11,5	12,4	13,5	13	12,5	16	13,2	13,9	14,1	13,8	14	16,5	13	13,7	14	9,5	11	11,5	10,5	12,4	6
Z	4	3,8	3,5	3	2,7	2,5	4	4	3	2,5	2,9	3,2	2,7	3	4	3,2	3,5	4,2	4	4,3	3,6	3,6	4	2	2,5	2,7	2		3,34	

Fig. 20

avons titré en effet dans des conditions très variables 29 fois les sérums Y et Z et 25 fois les sérums W et X. Le tableau N° 20 récapitule les résultats obtenus : les résultats ne s'écartant que de ± 20 % des résultats moyens de chacun de ces sérums (soit 7,8 - 2,81 - 12,46 et 3,34 pour les sérums W, X, Y et Z), constituent 84 % de l'ensemble des résultats pour W, 78 % pour X, 86 % pour Y et 70 % pour Z ; dans les limites de ± 30 % ces pourcentages deviennent respectivement 92 %, 92 %, 100 % et 90 % pour ces mêmes sérums. Etant donné l'imprécision des limites des taux dits « normaux » et l'amplitude des augmentations dans les cas pathologiques, de tels écarts de ± 20 %, voire ± 30 %, pour importants qu'ils soient, n'en sont pas moins fort acceptables en clinique.

D'une façon générale, ces résultats sont très comparables à ceux étudiés dans le chapitre VII. On peut donc en conclure que chaque fois que les conditions de dosage rendent une lecture terminale possible, les résultats obtenus sont analogues à ceux découlant d'une manipulation effectuée dans des conditions précises de la méthode type. L'utilisation du sérum comme élément de référence au lieu du substrat, non seulement permet une meilleure comparaison des résultats obtenus par des laboratoires différents, mais encore assure dans un même laboratoire une certaine sécurité contre une variation intempestive des conditions expérimentales.

Aussi pensons-nous que, non seulement il est souhaitable que les travaux à venir sur l'antipneumohyaluronidase s'effectuent selon une technique utilisant un sérum de référence, mais encore que cette façon de concevoir les dosages d'antienzymes d'origine bactérienne doit être généralisée.

Bien plus, que l'on utilise comme sérum de référence un sérum test international (comme dans les dosages d'antistreptolysine et d'antistaphylolysine) ou des sérums des sujets témoins normaux comme pour le dosage d'antistreptokinase selon la technique de A. Bertoye, M. Carraz, Detolle, nous estimons que les résultats devraient être exprimés par rapport à un taux considéré comme normal, en multiples de ce taux normal. Il est gênant pour le clinicien que les taux d'antistreptohyaluronidase s'échelonnent de 1.000 à 10.000 unités pour une méthode (M. Carraz, J. Vial), de 500 à 5.000 pour une autre (V. Faber), que l'antistreptokinase s'exprime en unités Christensen, ou en multiple des taux normaux, que l'antistreptolysine varie normalement de 50 à 300 unités, alors que

l'antistaphylolysine (qui se dose selon le même principe et se réfère également à un sérum international titré) demeure entre 0,50 et 2 unités. Il est vraisemblable qu'à cette liste actuelle d'antienzymes couramment dosées, s'adjoindront l'antipneumolysine et l'antipneumohyaluronidase, l'antistaphylohyaluronidase et l'antistaphylokinase. Plutôt que la création d'unités nouvelles, la référence au taux normal permettrait une certaine unité de notation des résultats. Si les élévations des diverses antienzymes d'un même germe (Streptocoque, ou Staphylocoque, ou Pneumocoque) se réalisent de façon similaire pour les différentes antienzymes (par exemple si une augmentation de 8 à 10 fois le taux normal d'une antienzyme A correspond — autant que cliniquement on puisse en juger — à une augmentation de 8 à 10 fois le taux normal d'une antienzyme B), ce système de notation se présentera comme un système très cohérent. Il est plus probable que des discordances se manifesteront (une augmentation de 8 à 10 fois le taux normal pour l'antienzyme A correspondant par exemple à une élévation de 12 à 15 fois le taux normal pour l'antienzyme B, dans l'exemple ci-dessus) ; dans ce cas, il suffira de multiplier le taux obtenu par un coefficient (par exemple 1,5 pour A et 1 pour B, dans l'exemple ci-dessus), pour obtenir un nombre que l'on pourrait dénommer INDICE (comparable à l'indice d'Haptoglobine), cette notation entraînant une cohésion beaucoup plus grande dans l'expression des résultats et une facilité accrue dans leur interprétation. Il n'est même pas exclu que cette notion d'INDICE d'augmentation puisse avoir une valeur de comparaison non seulement à l'intérieur d'un groupe d'antienzymes de même origine bactérienne, mais encore dans les antienzymes issues de bactéries différentes.

CONCLUSION

Dans le cadre d'une étude générale sur les antienzymes d'origine streptococcique, staphylococcique et pneumococcique, nous nous sommes attachés au point particulier du dosage de l'antipneumohyaluronidase sérique. Nous avons étudié les différents facteurs qui influent sur la marche de la réaction, et avons comparé les résultats obtenus en utilisant comme élément de référence du système réactionnel soit le substrat (acide hyaluronique), soit un sérum pris comme étalon. Nous avons également étudié la conservation des réactifs utilisés dans ces dosages.

La discussion de nos résultats expérimentaux nous a amené à préconiser une technique dérivant de celle décrite par V. Faber pour les antistreptohyaluronidases, mais en utilisant comme élément de référence un sérum témoin « normal ».

Les résultats de ces travaux semblent pouvoir dépasser le cadre des antihyaluronidases pneumococciques et il nous paraît que des techniques analogues à celle décrite, utilisant toujours comme référence un sérum témoin normal, pourraient être pratiquées pour des déterminations des antikinases, antihyaluronidases et antilysines correspondant aux Pneumocoques, Streptocoques et Staphylocoques.

Vu : Le Doyen
H. HERMANN

Le Président de la Thèse :
M. CROIZAT

Vu et permis d'imprimer :
LYON, le 2 Mars 1963

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. BERTOYE A., CARRAZ M., DETOLLE P. — Etude comparative des taux d'antistreptokinase chez les sujets sains et au cours des différentes maladies. *Lyon Méd.*, 1952, 84, 241-52.
2. BERTOYE A., CARRAZ M., DETOLLE P. — Sur une méthode d'évaluation des taux d'antistreptokinase dans le sang. *C.R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 1322-23.
3. CARRAZ M., VIAL J. — Détermination du taux de l'antihyaluronidase streptococcique et son intérêt dans le diagnostic de la maladie de Bouillaud. *Rev. Lyonn. Méd.*, 1954, 3, 673-81.
4. DI CAPRIO J.M., RANTZ L.A., RANDALL E. — Studies on streptococcal hyaluronidase and antihyaluronidase. *Arch. Int. Med.*, 1952, 89, 374-386.
5. DOREMAN A., OTT M. — A turbidimetric method for the essay of hyaluronidase. *J. Biol. Chim.*, 1948, 172, 367.
6. FABER V. — Anti streptococcal hyaluronidase. The turbidimetric determination of anti streptococcal hyaluronidase (A.S.H.) in sera from patients with rheumatic fever, glomerulo nephritis, tonsillitis and rheumatoid arthritis. *Acta Med. Scand.*, 1953, 147, 121-132.
7. FABER V. — Streptococcal hyaluronidase. Review and the turbidimetric method for its determination. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1952, 31, 345-354.
8. FABER V. — The turbidimetric method for determination of A.S.H. in serum. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1953, 32, 147.
9. HARRIS T.N., HARRIS J. — Studies in the relation of the hemolytic streptococcus to rheumatic fever. V. Streptococcal anti-hyaluronidase (M.C.P. Test) titers in the sera of patients with rheumatic fever, streptococcal infection and others. *Ann. J. Med. Sc.*, 1949, 217, 174-186.
10. HARRIS S., HARRIS T.N. — The measurement of neutralizing antibodies to streptococcal hyaluronidase by a turbidimetric method. Turbidimetric measurement of streptococcal anti hyaluronidase in the sera of patients with streptococcal infection and rheumatic fever. *J. Immunol.*, 1949, 63, 233-260.
11. HUMPHREY J.H. — Antigenic properties of hyaluronic acid. *Bioch. Journal*, 1943, 37, 460-462.

12. KULONEN E. — On hyaluronidase inhibitor in human blood. *Acta Med. Scand.*, 1950, 136, 401.
13. LEONARD S.L., PERLMAN R.L., KURZOCK R. — A turbidimetric method for determining hyaluronidase in serum and tissue extract. *Endocrinology*, 1946, 39, 261.
14. Mc CLEAN. — Studies on diffusing factors : 2. Method of essay of hyaluronidase and their correlation with skin diffusing activity. *Biochemic. J.*, 1943, 37, 169.
15. MEYER K. — The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.*, 1947, 27, 335-359.
16. QUINN R.W. — Studies of the mucin clot prevention test for the determination of the antihyaluronidase titer in human serum. *J. Clin. Test*, 1948, 27, 463-476.
17. SMITH K., FABER V. — The turbidimetric method for determination of hyaluronidase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1950, 3, 292.
18. THOMPSON R.T., BLANKENHORN M.A. — Antipneumococcus hyaluronidase activity in human serum ; rise in titer following pneumococcus bacteremia with purulent infection of pleura and synovia. *Journal of Laboratory and Clinical Med.*, 1946, 31, 462.
19. THOMPSON R.T. — Antihyaluronidase activity in human serum which inactivates the hyaluronidases of type I, II and VII pneumococci ; rise in titer following pneumococcus bacteremia. *J. of Lab. Clin. Med.*, 1947, 32, 1407.
20. THOMPSON R.T. — Antihyaluronidase antigenic to pneumococcus hyaluronidase in the serum of normal human beings and patients with pneumococci pneumonia ; rise of titer in the bacteremia pneumococci pneumonia. *J. of Lab. and Clin. Med.*, 1948, 33, 919.
21. THOMPSON R.T., MOSES F.E. — Thermostable inhibition of bacterial hyaluronidases by the serum of normal human beings. *Science*, 1949, 110, 70-71.
22. THOMPSON R.T., MOSES F.E. — The thermostable inhibition of bacterial hyaluronidase by the serum of normal human beings. *Federation Proceedings*, 1949, 8, 372.
23. TOLKSDORF S., MAC CREADY M.H., MAC CULLAGH D.R., SCHWENK E. — The turbidimetric essay of hyaluronidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 1949, 34, 74.
24. TUNEVALL G. — The antipneumolysin reaction and its clinical application. *Scand. Journ. of Clin. Lab. Invest.*, 1953, Vol. 5, N° 2.

TABLE DES MATIERES

<i>Chapitre I.</i> — INTRODUCTION	15
<i>Chapitre II.</i> — DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISÉES	21
1. — REACTIFS	21
A. — Acide hyaluronique	21
B. — Hyaluronidase pneumococcique	21
C. — Réactif sérique et sérum acidifié	24
D. — Tampons I et II	26
E. — Sérum étalon	26
2. — MATERIEL	27
3. — MODE OPERATOIRE	27
A. — Technique utilisant comme référence l'acide hyaluronique (Technique A.H.)	27
a) Neutralisation de l'enzyme par l'antienzyme et mise en route de la galerie de vérification de la pneumohyaluronidase	28
b) Action enzymatique	28
c) Mise en évidence de l'acide hyaluronique non dépolymérisé	28
d) Calcul et expression des résultats	30
B. — Technique utilisant comme référence un sérum moyen dit « Etalon » (Technique S.E.)	30
C. — Mode opératoire suivi dans ce travail	32
<i>Chapitre III.</i> — INFLUENCE DES MODIFICATIONS DE TEMPÉRATURE ET DE DURÉE D'ACTION DES DIFFÉRENTS RÉACTIFS ..	35
A. — Au stade de la neutralisation antigène-anticorps	35
B. — Au stade de l'action enzymatique	40
C. — Au stade de lecture turbidimétrique après addition du réactif sérique	47
<i>Chapitre IV.</i> — INFLUENCE DES QUANTITÉS DE RÉACTIFS EN PRÉSENCE	49
A. — Variation des quantités globales de tous les réactifs	49
B. — Variation du titre de la pneumohyaluronidase employée ..	50
C. — Variation de la dilution des sérums	53
<i>Chapitre V.</i> — INFLUENCE DU MILIEU RÉACTIONNEL	55
A. — I. Influence du tampon acéto-acétique à divers pH et à diverses molarités	55
II. Influence du tampon phosphaté de Sørensen à divers pH et à diverses molarités	67
B. — Influence des sels du bouillon de culture, renfermant la pneumohyaluronidase, sur la réaction	74
<i>Chapitre VI.</i> — ESSAI DE CONSERVATION DES RÉACTIFS	77
<i>Chapitre VII.</i> — CONSTANCE DES RÉSULTATS DANS LA TECHNIQUE UTILISANT UN SÉRUM ÉTALON	83
<i>Chapitre VIII.</i> — DISCUSSIONS SUR LE CHOIX D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE	85
<i>Chapitre IX.</i> — CONCLUSION	90

